

SÉRIE A. N° 1667

N° D'ORDRE : 2533

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ
DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

M. Roger REILHES

1^{re} THÈSE

1^{re} Thèse. — STÉRIDES ET PHOSPHOLIPIDES DANS LE SYSTÈME
VACUOLAIRE DE LA CELLULE VÉGÉTALE.

2^e Thèse. — RESPIRATION DE LA FLEUR.

Soutenues le 5 nov^{bre} 1936 devant la Commission d'examen.

MM. GUILLIERMOND... *Président.*

COMBES..... }
PLANTEFOL..... } *Examineurs.*



RENNES
IMPRIMERIES OBERTHUR

—
1936

SÉRIE A. N° 1667

N° D'ORDRE : 2533

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ
DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

M. Roger REILHES

1^{re} THÈSE

1^{re} Thèse. — STÉRIDES ET PHOSPHOLIPIDES DANS LE SYSTÈME
VACUOLAIRE DE LA CELLULE VÉGÉTALE.

2^e Thèse. — RESPIRATION DE LA FLEUR.

Soutenues le

devant la Commission d'examen.

MM. GUILLIERMOND.. *Président.*

COMBES..... }
PLANTEFOL..... } *Examineurs.*



RENNES
IMPRIMERIES OBERTHUR

1936

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire..... M. MOLLIARD.
Doyen..... C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du Globe.

Professeurs honoraires.	{	H. LE CHATELIER.	GOURSAT.	BLAISE.
		H. LEBESGUE.	WALLERANT.	DANGEARD.
		A. FERNBACH.	GUILLET.	JANET.
		A. LEDUC.	PÉCHARD.	LESPIEAU.
		Émile PICARD.	FREUNDLER.	MARCHIS.
		Léon BRILLOUIN.	AUGER.	VESSIOT.

PROFESSEURS

G. BERTRAND....	T Chimie biologique.	ROBERT-LÉVY...	Zoologie.
M. CAULLERY....	T Zoologie (Évolution des êtres organisés)	F. PICARD.....	Zoologie (Évolution des êtres organisés).
G. URBAIN.....	T Chimie générale.	Henri VILLAT....	T Mécanique des fluides et applications.
Émile BOREL....	T Calcul des probabilités et Physique mathématique.	Ch. JACOB.....	T Géologie.
Jean PERRIN....	T Chimie physique.	P. PASCAL.....	T Chimie minérale.
H. ABRAHAM....	T Physique.	M. FRÉCHET....	T Calcul différentiel et Calcul intégral.
E. CARTAN.....	T Géométrie supérieure.	E. ESCLANGON...	T Astronomie.
M. MOLLIARD....	T Physiologie végétale.	M ^{me} RAMART- LUCAS.	T Chimie organique.
L. LAPICQUE....	T Physiologie générale.	H. BÉGHIN.....	T Mécanique physique et expérimentale.
A. GUICHARD....	T Recherches physiques.	FOCH.....	Mécanique expérimentale des fluides.
J. DRACH.....	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	PAUTHENIER....	Physique (P. C. B.).
Charles FABRY...	T Enseignement de Physique.	De BROGLIE....	T Théories physiques.
Charles PÉREZ...	T Zoologie.	CHRÉTIEN.....	Optique appliquée.
Léon BERTRAND..	T Géologie structurale et Géologie appliquée.	P. JOB.....	Chimie générale.
P. PORTIER.....	T Physiologie comparée.	LABROUSTE....	Physique du Globe.
E. RABAUD.....	T Biologie expérimentale.	PRENANT.....	Zoologie.
M. GUICHARD....	T Chimie minérale.	VILLEY.....	Mécanique physique et expérimentale.
Paul MONTEL....	T Théorie des fonctions et Théorie des transformations.	BOHN.....	Zoologie (P. C. B.).
P. WINTREBERT..	T Anatomie et Histologie comparées.	COMBES.....	Botanique (P. C. B.).
L. BLARINGHEM..	T Botanique.	GARNIER.....	T Mathématiques générales.
O. DUBOSCQ....	T Biologie maritime.	PÈRES.....	Mécanique théorique des fluides.
G. JULIA.....	T Mécanique analytique et Mécanique céleste.	HACKSPILL....	Chimie (P. C. B.).
C. MAUGUIN....	T Minéralogie.	LAUGIER.....	Physiologie générale.
A. MICHEL-LÉVY.	T Pétrographie.	TOUSSAINT....	Technique Aéronautique.
H. BÉNARD.....	T Mécanique expérimentale des fluides.	M. CURIE.....	Physique (P. C. B.).
A. DENJOY.....	T Application de l'analyse à la Géométrie.	G. RIBAUD....	T Hautes températures.
L. LUTAUD.....	T Géographie physique et Géologie dynamique.	CHAZY.....	T Mécanique rationnelle.
Eugène BLOCH...	T Physique théorique et Physique céleste.	GAULT.....	Chimie (P. C. B.).
G. BRUHAT.....	Physique.	CROZE.....	Recherches. Physiques.
E. DARMOIS....	Enseignement de physique.	DUPONT.....	T Théories chimiques.
A. DEBIERNE....	T Physique Générale et Radioactivité.	LANQUINE....	Géologie.
A. DUFOUR.....	T Physique (P. C. B.).	VALIRON.....	Mathématiques générales.
L. DUNOYER....	T Optique appliquée.	BARRABÉ.....	Géologie structurale et Géologie appliquée.
A. GUILLIERMOND	T Botanique.	MILLOT.....	Zoologie (P. C. B.).
M. JAVILLIER...	Chimie biologique.	F. PERRIN....	Théories physiques.
L. JOLEAUD....	Paléontologie.	VAVON.....	Chimie organique.
		G. DARMOIS....	Calcul des probabilités et Physique-Mathématique.

Secrétaire..... A. PACAUD.

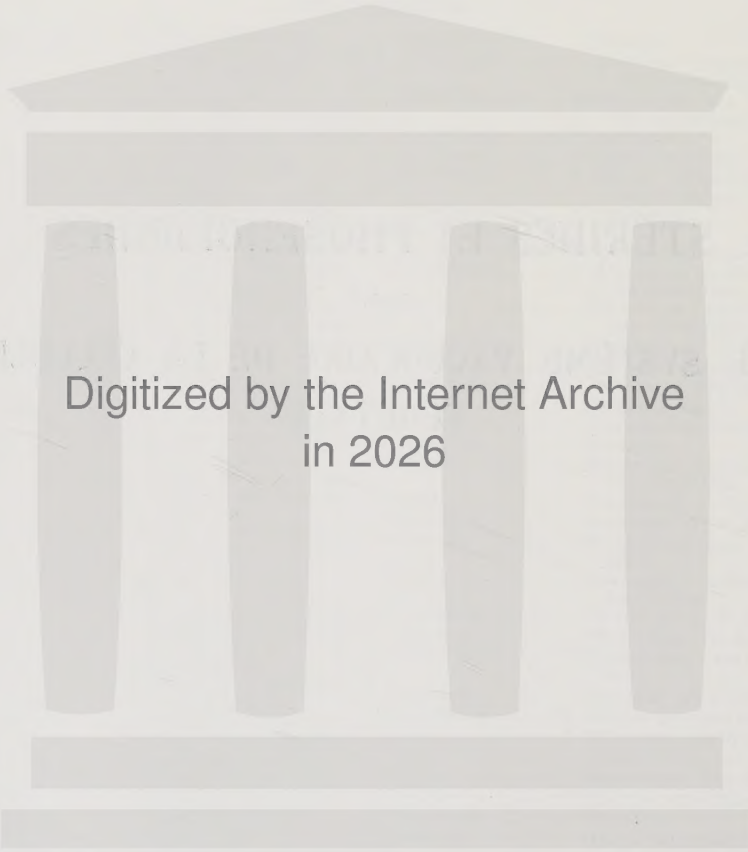
Secrétaire honoraire..... D. TOMBECK.



STÉRIDES ET PHOSPHOLIPIDES

DANS

LE SYSTÈME VACUOLAIRE DE LA CELLULE
VÉGÉTALE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A LA MÉMOIRE
DU PROFESSEUR
MARCEL MIRANDE

STÉRIDES ET PHOSPHOLIPIDES

DANS

LE SYSTÈME VACUOLAIRE DE LA CELLULE

VÉGÉTALE

par M. ROGER REILHES

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION.....	9
PRINCIPAUX CARACTÈRES DISTINCTIFS DES LIPIDES DANS LES TISSUS VÉGÉTAUX ÉTUDIÉS :	
Action de quelques fixateurs.....	13
Coloration par le Soudan.....	13
Coloration par le bleu d'indophénol.....	15
Distinction des huiles essentielles.....	17
Coloration par le réactif de Schiff.....	17
Caractères particuliers des glycérides et des acides gras.....	18
Caractères particuliers des stérols et des stérides.....	18
Caractères particuliers des phospholipides.....	20
LES CONCRÉTIONS LIPIDIQUES INTRAVACUOLAIRES :	
Bulbes de Lis.	
Historique.....	23
Étude morphologique.....	29
Étude histochimique.....	35
Vérifications <i>in vitro</i>	47
Fleurs de Lis.	
<i>Lilium candidum</i>	49
<i>Lilium longiflorum Harrisii</i>	51
<i>Lilium speciosum</i>	52
Publication posthume du travail de MIRANDE.....	53
Feuilles et fleurs d'Iris.	
Historique.....	55
Résultats de nos recherches.....	58
Conséquences pour la classification des principales espèces d' <i>Iris</i>	66
Feuilles de Haworthia cymbiformis.	
Historique.....	69
Résultats de nos recherches.....	70
Conclusion.....	71

LES CONCRÉTIONS LIPIDIQUES INTRAVACUOLAIRES ET LA TEMPÉRATURE :

Bulbe de <i>Lilium candidum</i>	73
Fleurs de <i>Lis</i>	82
Feuilles d'<i>Iris</i>	84

STÉRIDES ET PHOSPHOLIPIDES EN PSEUDO-SOLUTION DANS LES VACUOLES :

Résultats obtenus sur des tissus préalablement fixés.

Bulbe de <i>Lis</i>	88
Feuille et racine d' <i>Iris</i>	89
Racines de Blé, Orge, <i>Lis</i> , Ricin, Courge, Haricot et Pois.....	90

Coloration des jeunes vacuoles par le bleu d'indophénol.

Bulbe de <i>Lis</i>	93
Racine de <i>Lis</i>	94
Feuille et racine d' <i>Iris</i>	95
Racine de Jacinthe.....	95
Racines de Haricot et de Pois.....	96
Racine de Ricin.....	96
Racines de Melon et de Courge.....	97
Racines de Blé et d'Orge (hordénine).....	97

Coloration des vacuoles par le Soudan en pseudo-solution aqueuse phospholipidique.

Préparation et propriétés de la solution aqueuse de lécithine.....	100
Écailles bulbaires de <i>Lis</i> et feuilles d' <i>Iris</i>	101
Plantules de Blé : absorption de la lécithine et localisation de ce corps dans les vacuoles.....	103

Pigments anthocyaniques et composés oxyflavoniques associés aux lipides intravacuolaires.

Coloration par le pigment anthocyanique extrait du Chou rouge.	109
Caractérisation des composés oxyflavoniques dans les écailles en voie de dessiccation.....	111

Conclusion.....

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....

BIBLIOGRAPHIE.....

EXPLICATION DES PLANCHES.....

INTRODUCTION

Tandis que divers produits de l'activité cellulaire comme l'amidon, la chlorophylle, le carotène, sont accumulés à l'endroit même de leur formation, dans les plastes, le plus grand nombre (tanins, alcaloïdes, etc.) se trouve déversé dans les vacuoles, enclaves aqueuses de la matière vivante. Cependant, on sait que les lipides constituent des enclaves particulières sous forme de globules oléagineux intracytoplasmiques. Mais, comme il s'agit là de lipides non miscibles avec l'eau (glycérides), on peut se demander si les « lipoides » (stérides, phospholipides), particulièrement hydrophiles, ne peuvent être déversés et accumulés dans le système vacuolaire. On a signalé, d'ailleurs, cette accumulation dans un cas particulier : l'épiderme des bulbes de Lis montre, en effet, d'après Marcel MIRANDE, la localisation dans le vacuome d'un phytostérol que ce savant appelle la « liliostérine vacuolaire générale ». MIRATON a, de plus, signalé que les « stérinoplastes », décrits par MIRANDE dans le bulbe de Lis blanc, se trouvent également situés dans les vacuoles des cellules épidermiques.

Nous avons, tout d'abord, entrepris l'étude morphologique détaillée des corps concrétionnés dans l'épiderme des écailles successives du bulbe de *Lilium candidum*, en suivant l'évolution normale du vacuome. Le mouvement de chute de ces concrétions dans les vacuoles nous permet de suivre les variations de la viscosité du suc vacuolaire. Cherchant ensuite à réaliser la coloration par le Soudan III, en solution alcoolique, de ces corps extrêmement solubles dans l'alcool nous serons amenés à reconnaître leur constitution essentiellement phospholipidique. Nous rechercherons cependant les phytostérides tant dans les écailles fraîches que dans les écailles desséchées. Dans ces dernières, tout le vacuome se trouvant concrétionné sous forme de masses pelotonnées remplissant complètement les cellules épidermiques mortes, nous pourrions vérifier *in vitro*, après extraction à l'alcool, la constitution chimique envisagée précédemment.

Comme l'a montré MIRANDE, on trouve des masses lipidiques concrétionnées dans les écailles sèches des bulbes de nombreuses espèces de Lis, mais les « stérinoplastes » (concrétions lipidiques intravacuolaires) n'existent que dans l'espèce *L. candidum*. Nous chercherons à déterminer expérimentalement la disparition et la réapparition de ces corps lipidiques intravacuolaires, sous l'effet des variations de température, afin d'établir un rapport entre la richesse particulière du Lis blanc en lipides et son mode bien spécial de végétation hivernale.

Des corps analogues aux « stérinoplastes », décrits par MIRANDE dans le bulbe de *Lilium candidum*, peuvent exister comme nous le

verrons dans les fleurs de diverses espèces de *Lis*. Mais leur présence se révèle être remarquablement inconstante suivant l'époque de floraison. Sur ce point, la publication posthume du dernier travail de MIRANDE nous apporte des données précises que nous comparerons aux résultats, déjà publiés, de nos propres recherches.

Les feuilles et les pièces florales d'*Iris* renferment, dans les vacuoles de leurs cellules épidermiques, des globules d'aspect oléagineux. Ces corps ressemblant d'assez près aux « stérinoplastes » (concrétions lipidiques intravacuolaires), nous pouvons les étudier en fonction des résultats précédemment obtenus dans le bulbe de *Lis*. Dans les *Iris* cependant, contrairement à ce qui se produit pour les divers *Lis*, la présence des corps intravacuolaires dans l'épiderme des pièces florales est constante pendant toute la durée de la floraison chez une espèce déterminée. Aussi chercherons-nous à baser sur ce caractère cytochimique un classement sommaire des *Iris*.

Dans les plus jeunes cellules des écailles de *Lis* ou des feuilles d'*Iris*, en étudiant l'apparition des corps concrétionnés à l'intérieur des vacuoles, nous sommes conduits à envisager la constitution de la substance vacuolaire primitive. Nous essayerons de mettre en évidence la présence de lipides dans la solution colloïdale intravacuolaire, particulièrement dans les cellules du méristème des racines de Blé et d'Orge. Nous étudierons enfin l'absorption de la lécithine, en solution aqueuse colloïdale, par les plantules de Blé.

* * *

C'est à M. le professeur A. GUILLIERMOND, Membre de l'Académie des Sciences, que nous devons d'avoir entrepris et conduit jusque là nos recherches. Puisse ce travail, qu'il nous fait l'honneur de publier dans la *Revue de Cytologie*, constituer à ses yeux un modeste témoignage de notre reconnaissance.

Nous adressons aussi nos remerciements à M. le professeur R. COMBES qui, nous ayant orienté il y a quelques années vers les études cytochimiques, s'est toujours montré disposé à nous aider dans l'interprétation des résultats obtenus. M. MANGENOT, professeur à la Faculté des Sciences de Rennes, a conduit nos premiers pas : nous lui devons notre initiation à la recherche scientifique. Nous remercions enfin de la bienveillante attention qu'il a prêtée à notre travail, M. le professeur R. SAVELLI, directeur du jardin botanique de Catane.

Nous avons toujours trouvé le matériel désirable dans les services de la Culture au Muséum, grâce à l'amical appui de M. EICHHORN et à l'affabilité de M. GUINET. C'est à M. LISON que nous sommes redevable de l'emploi du noir Soudan B, nouveau colorant histologique

des lipides. Nous remercions également M. GATTEFOSSÉ qui nous a envoyé deux bulbes de Lis blanc, cultivé depuis dix ans au Maroc. Nous devons enfin à la maison Vilmorin et Andrieux d'avoir pu disposer de plusieurs centaines de bulbes de Lis blanc.

Nous adressons, en terminant, à tous ceux qui travaillent autour de M. GUILLIERMOND et maintiennent dans le laboratoire une atmosphère d'entr'aide et de cordialité, particulièrement à M^{me} HUREL-PY, à M^{lle} DELAPORTE, ainsi qu'à MM. CHAZE et GAUTHERET, l'expression de notre vive gratitude.

PRINCIPAUX CARACTÈRES DISTINCTIFS DES LIPIDES DANS LES TISSUS VÉGÉTAUX ÉTUDIÉS

Action de quelques fixateurs.

Les corps lipidiques, étudiés au cours de ce travail, présentent tous les degrés de solubilité dans le formol (mélange de formaldéhyde et d'alcool méthylique) et leur dissolution peut même être immédiate. Cependant ils sont généralement conservés dans le liquide fixateur de Regaud qui ne les dissout jamais entièrement. Leur conservation est ici due à la présence du bichromate de potassium qui, employé seul à la concentration de 3 p. 100, nous permet toujours de fixer en 48 heures sans altération les corps lipidiques étudiés.

L'acide osmique (tétroxyde d'osmium) noircit les corps gras en même temps que les tanins, les résines, les essences, les composés oxyflavoniques et les pigments anthocyaniques. Ce noircissement d'intensité variable ne permet aucune conclusion certaine d'ordre histochimique. Pour la fixation on peut employer le mélange chromo-osmique indiqué par ZWEIBAUM [111] :

Acide osmique à 1 p. 100.....	2 parties
— chromique —	3 —
Bichromate de potassium à 3 p. 100.....	3 —

Coloration par le Soudan.

Les colorants les plus employés pour distinguer les corps lipidiques des autres constituants cellulaires sont incontestablement le Soudan III et le Scarlach (qui colorent également les essences). Cependant on obtient, d'après LISON, une coloration plus nette des lipides avec d'autres colorants, particulièrement avec le noir Soudan B [52].

On emploie généralement ces colorants en solution dans l'alcool à 70 degrés ou dans l'hydrate de chloral. On peut aussi les dissoudre dans le lacto-phénol d'Amann : 1 g. d'acide phénique cristallisé + 1 g. d'acide lactique + 2 g. de glycérine + 1 g. d'eau distillée. Le savon liquide sert également de solvant : il permet d'opérer la coloration des graisses en milieu aqueux [42]. Enfin, il est avantageux d'employer, dans certains cas, ces colorants spécifiques en solution dans la diacétine [28].

Tous les solvants employés pour dissoudre les colorants des lipides dissolvent plus ou moins ces mêmes lipides. Ainsi nous avons observé qu'en utilisant le Soudan III en solution dans l'alcool, dans l'hydrate de chloral ou dans le lacto-phénol d'Amann, les granulations lipidiques peuvent être rapidement dissoutes sans que l'on observe la moindre coloration. Le savon liquide dissout également les corps gras, moins rapidement il est vrai que l'alcool, mais comme la coloration est considérablement ralentie nous n'avons pas obtenu par ce moyen de meilleurs résultats. La diacétine enfin dissout encore assez souvent les corps lipidiques; de plus elle n'est pas miscible avec l'eau. Aussi se trouve-t-elle divisée sur la préparation en nombreux globules ne permettant plus de reconnaître les corps étudiés si l'on n'a pas, au préalable, séché soigneusement le tissu avec du papier buvard.

Cette coloration des lipides n'est pas un phénomène de teinture : c'est un phénomène purement physique de dissolution entièrement régi par la loi de Henry sur le coefficient de partage. La matière colorée est extraite d'un solvant médiocre par le corps gras, bien meilleur solvant [51].

Mais il arrive, comme nous l'avons vu précédemment, que les corps lipidiques se trouvent rapidement et complètement entraînés eux-mêmes en dissolution. Le phénomène est alors beaucoup plus compliqué. Il n'est généralement pas possible, d'autre part, de fixer au préalable par le formol qui dissout ces corps le plus souvent. Cependant, après fixation pendant 24 heures dans le mélange chromosmique, dans certains cas, les corps lipidiques ne sont plus dissous par le Soudan alcoolique et se colorent en rouge. Dans le bichromate de potassium à 3 p. 100 au bout de 48 heures les mêmes corps deviennent bien insolubles dans l'alcool, mais ils peuvent présenter une teinte jaune assez accentuée, en rapport avec la présence de composés oxyflavoniques, ce qui ne permet pas de réaliser avec netteté la coloration rouge orangé par le Soudan III. Par contre, nous pouvons toujours obtenir, après cette fixation, un résultat pleinement positif avec le noir Soudan B.

Étant donné les altérations que subissent ainsi les corps lipidiques dans les divers fixateurs, nous avons cherché le moyen de réaliser sans fixation préalable la coloration par le Soudan III en solution alcoolique de ces corps extrêmement solubles dans l'alcool. Il faut pour cela faire dissoudre jusqu'à saturation dans la solution alcoolique du colorant la substance à colorer. Dans ces conditions, le Soudan III se trouvera partagé entre une solution alcoolique saturée de lipides et ces mêmes lipides restant insolubles dans le tissu; le partage s'effectuera au bénéfice de ces derniers, apparaissant ainsi colorés.

Après avoir constaté sous le microscope la présence des corps étudiés nous immergeons, en grand nombre et successivement, les

lambeaux de tissu dans une petite quantité de Soudan III dissous à saturation dans de l'alcool à 70 degrés. Dans les premiers lambeaux, l'immersion rapide suffit pour faire disparaître complètement ces corps. Mais, peu à peu, cette dissolution se ralentit et finalement nous retrouvons dans le tissu, sous le microscope, des corps lipidiques colorés.

Au lieu d'opérer par tâtonnement nous pouvons, d'un seul coup, traiter un grand nombre de fragments du tissu par de l'alcool à 70 degrés, entraînant ainsi les corps lipidiques en dissolution. Après l'avoir filtrée, concentrons cette liqueur alcoolique en ajoutant du Soudan III dissous à saturation dans de l'alcool à 70 degrés. Le colorant obtenu, introduit sous lamelle, ne dissout que lentement les corps lipidiques, permettant ainsi d'observer leur coloration.

Les corps lipidiques étudiés se dissolvant sans se colorer dans le Soudan III à l'alcool, nous cherchons également à ralentir leur dissolution en faisant dissoudre dans la solution alcoolique du Soudan des lipides définis : cholestérol, lécithine. En opérant ainsi nous déterminons la composition des corps étudiés : par exemple, si leur coloration se trouve réalisée en ajoutant de la lécithine c'est qu'ils renferment une proportion importante de phospholipides, ces phospholipides condensés dissolvant électivement le Soudan aux dépens de la solution alcoolique de lécithine.

Nous pouvons obtenir, dans certains cas, cette coloration sous lamelle avec le Soudan III en solution alcoolique, la solubilité des corps étudiés étant suffisamment diminuée, en immergeant au préalable pendant quelques minutes le tissu dans l'eau oxygénée que nous additionnons en même temps de bichromate de potassium en solution aqueuse à 3 p. 100 (dégagement rapide d'oxygène). Au lieu d'oxyder ainsi les corps lipidiques pour les rendre assez peu solubles dans l'alcool, nous pouvons d'abord immerger le tissu pendant plusieurs jours dans une solution aqueuse à 10 p. 100 de chlorure de cadmium additionné de chlorure de magnésium, puis opérer sous lamelle la coloration avec du Soudan alcoolique saturé des mêmes sels (le chlorure de cadmium additionné de chlorure de magnésium a la propriété de précipiter la lécithine en solution alcoolique).

Enfin, nous montrerons à la fin de ce travail que l'on peut utiliser le Soudan III ou le noir Soudan B en pseudo-solution aqueuse phospholipidique (solution aqueuse colloïdale de lécithine additionnée de Soudan en poudre).

Coloration par le bleu d'indophénol.

Le bleu d'indophénol naissant introduit dans la technique histo-chimique végétale par ZWEIBAUM et MANGENOT permet de colorer les

corps lipidiques en même temps que les tannoïdes et les essences. On le prépare avec les deux solutions suivantes :

Solution A :

Potasse caustique.....	0,2 g.
Naphtol α	0,5 g.
Eau distillée.....	100 cc.

On chauffe légèrement pour faire dissoudre le naphtol dans la solution alcaline.

Solution B :

Chlorhydrate de diméthyl-paraphénylène- diamine.....	0,5 g.
Eau distillée.....	100 cc.

On prend 3 cc. de chacune de ces solutions et on ajoute 20 cc. d'eau [45]. L'oxydation à l'air libre du mélange « nadi » ainsi obtenu détermine une synthèse progressive de l'indophénol qui apparaît à l'état de suspension colloïdale. Grâce à cette particularité, le colorant pénètre dans la cellule sans déterminer de plasmolyse et se dissout instantanément dans les inclusions lipidiques. Le véhicule étant aqueux et d'une faible toxicité, on évite des bouleversements trop brutaux de l'architecture cytoplasmique [110].

Nous obtenons directement le même colorant (nadi) en mélangeant simplement à volumes égaux, au moment de l'emploi, les deux solutions :

A. — Potasse caustique.....	0,06 g.
Naphtol α	0,15 g.
Eau.....	130 cc.

(chauffer très légèrement pour obtenir la dissolution du naphtol sans que ce corps soit décomposé).

B. — Chlorhydrate de diméthyl-paraphénylène- diamine.....	0,15 g.
Eau.....	130 cc.

Ces deux solutions étant conservées en flacons bouchés, nous obtenons encore en les mélangeant du bleu d'indophénol donnant une bonne coloration quatre jours après leur préparation. Au bout de six jours, par contre, on n'obtient plus un résultat satisfaisant.

Par suite de sa teneur assez grande en potasse, le mélange nadi peut dissoudre rapidement certains corps lipidiques sans les colorer. Nous diminuons alors la proportion de potasse dans la mesure où l'on peut encore obtenir la dissolution du naphtol. C'est ainsi que nous réussissons à colorer de tels corps en composant la solution A suivant la formule :

Potasse caustique.....	0,03 g.
Naphtol α	0,15 g.
Eau.....	130 cc.

la solution B restant inchangée.

En diminuant jusqu'au dixième la proportion de potasse, nous arrivons même à réaliser de véritables colorations vitales dans certaines cellules : le vacuome prend une teinte bleue d'autant plus intense que la cellule est plus jeune, tandis que le noyau et le cytoplasme restent incolores. Nous obtenons ainsi des figures comparables à celles que l'on observe avec un colorant vital comme le rouge neutre. Cependant les globules oléagineux apparaissent en même temps colorés par le bleu d'indophénol dans le cytoplasme.

Sans diminuer la proportion de potasse, mais en additionnant le mélange nadi ordinaire d'un volume cent fois plus grand d'eau, le colorant très dilué ainsi obtenu servant de milieu de culture pour diverses plantules, nous obtenons plus nettement encore la coloration vitale du vacuome par le bleu d'indophénol dans les cellules situées à la pointe des racines.

Distinction des huiles essentielles.

Nous venons de voir que les essences se trouvent colorées en même temps que les lipides par le Soudan et par le bleu d'indophénol. Pour les caractériser il est nécessaire d'effectuer d'autres réactions.

D'après MESNARD, sous l'action des vapeurs d'acide chlorhydrique, les corps gras apparaissent colorés en jaune intense, tandis que les essences disparaissent. Peut-être valable pour les glycérides du cytoplasme, nous verrons que cette réaction ne permet pas de distinguer les corps lipidiques intravacuolaires des essences. Il en est de même de l'action du chloral [107].

Par contre, la saponification peut être obtenue d'après la méthode de MOLISCH [75] sur les corps lipidiques, si leur solubilité dans les alcalis n'est pas trop grande. On monte le tissu dans une solution concentrée de potasse additionnée de son volume d'ammoniaque et on lute les préparations à la vaseline. Plusieurs jours après, les gouttelettes de matières lipidiques se recouvrent de cristaux (acides gras) facilement reconnaissables au microscope polarisant. Dans les mêmes conditions, les essences ne forment des cristaux (résinate) que tout à fait exceptionnellement [80].

Coloration par le réactif de Schiff.

Ce réactif, constitué par une solution aqueuse de fuchsine décolorée par l'acide sulfureux (bisulfite de soude et acide chlorhydrique),

donne une coloration rouge violet intense (produits d'addition, bases colorées complexes) en présence de corps présentant un groupement non saturé dans leur molécule : rapidement avec les aldéhydes, lentement avec certaines cétones [108]. Sur les tissus animaux frais ou traités par l'alcool, la réaction est négative, mais sur les tissus fixés par le sublimé le réactif de Schiff donne, au contraire, des résultats positifs. Il existerait, d'après FEULGEN, un corps lipoidique largement répandu dans le protoplasme; sous l'action du sublimé ou bien des acides, ce corps donnerait facilement naissance à une substance, dite plasmale, de caractère aldéhydique. D'après les travaux de VERNE, la réaction n'a pas cette généralité, mais elle pourrait permettre de distinguer diverses sortes de lipides [104].

Dans les tissus végétaux, la coloration que nous obtenons par le réactif de Schiff peut être attribuée à la présence des lipides dans les corps étudiés, si nous montrons que ces corps ne sont pas en notable proportion composés d'huiles essentielles aldéhydiques, de tannoïdes et surtout de glucides. Le réactif de Schiff est en effet coloré directement par les aldoses et, après hydrolyse, par le saccharose, le maltose ou le lactose.

Caractères particuliers des glycérides et des acides gras.

Les glycérides constituent des globules particulièrement réfringents, localisés dans le cytoplasme. Ces globules intracytoplasmiques ne sont généralement pas dissous par l'alcool à 70 degrés ce qui permet d'obtenir directement leur coloration avec le Soudan alcoolique.

Les acides gras apparaissent souvent cristallisés et se dissolvent généralement dans l'alcool ainsi que dans la potasse. Ils semblent prendre naissance, aux dépens des substances phospholipidiques, dans certains tissus que nous traitons par l'acide sulfurique concentré ou que nous chauffons en atmosphère humide. Les acides gras solides et les savons ne sont pas colorables par le Soudan III [107].

Les glycérides et les acides gras ne se présentent jamais sous forme de sphéro-cristaux avec une croix noire de polarisation.

Caractères particuliers des stérols et des stérides.

Le cholestérol est soluble dans les solvants usuels des corps gras et, en outre, dans l'anhydride et l'acide acétiques.

HEINTZ a, le premier, constaté que l'acide sulfurique concentré colore en rouge le cholestérol. Nous avons répété cette réaction en opérant d'abord avec une solution alcoolique de cette substance. Par action de l'acide sulfurique concentré nous obtenons un précipité rouge brun insoluble dans l'alcool, même à chaud. Nous constatons,

d'autre part, que, sous l'action de l'acide sulfurique concentré, les cristaux blancs en tablettes de cholestérol sont intensément teints en rouge, l'acide restant à peu près incolore. Le cholestérol ainsi traité forme une masse pâteuse, constituée par des hydrocarbures [109], qui blanchit sans se dissoudre dans l'alcool bouillant; elle blanchit également par lavage dans l'eau et rougit à nouveau sous l'action répétée de l'acide concentré (1).

LIEBERMANN a montré qu'en ajoutant à une solution chloroformique de cholestérol dix gouttes d'anhydride acétique et une goutte d'acide sulfurique concentré, on obtient une coloration violacée qui vire ensuite au vert. La teinte verte obtenue permet même le dosage colorimétrique du cholestérol (méthode de Grigaut). Pour répéter cette réaction *in vitro* nous faisons dissoudre 1 p. 100 de cholestérol cristallisé dans 3 cc. de chloroforme, nous ajoutons 1 cc. d'anhydride acétique, puis de l'acide sulfurique concentré goutte à goutte. Nous obtenons une coloration vert clair qui devient en quelques minutes très foncée.

Pour obtenir cette réaction de Liebermann sur le tissu, ROMIEU a indiqué la technique suivante : essorer soigneusement la préparation au papier buvard, la couvrir d'une goutte d'acide sulfurique concentré, laisser agir 3 à 15 secondes, ajouter 2 ou 3 gouttes d'anhydride acétique, chasser le mélange au moyen de quelques gouttes d'anhydride, poser immédiatement une lamelle, luter à la paraffine pour éviter la formation d'acide acétique au contact de la vapeur d'eau de l'air; examiner immédiatement. Le cholestérol et ses éthers se trouvent ainsi colorés en violet lilas ou rouge pourpre tournant ensuite au vert [88]. Nous préférons rester plus près de la réaction initiale en montant, dans le chloroforme, la préparation soigneusement séchée avec du papier buvard (ou mieux encore le tissu ayant subi une dessiccation prolongée à l'air). Pour respecter les proportions observées *in vitro*, nous montons même le tissu desséché dans une goutte du mélange (3 cc. de chloroforme + 1 cc. d'anhydride acétique), préparé à l'avance. Nous ajoutons alors, sous lamelle, une trace d'acide sulfurique concentré.

WINDAUS a montré que les stérols libres donnent avec une solution alcoolique de digitonine un complexe insoluble, très bien cristallisé. Les cristaux de digitonine-stérol sont insolubles dans l'eau, l'acétone, l'éther, très peu solubles à froid dans l'alcool à 96 degrés, un peu plus solubles dans l'alcool bouillant, bien solubles dans l'acide acétique glacial et très solubles dans la pyridine. La technique suivante a été indiquée par LEULIER et NOËL : on place les fragments d'organes

(1) L'acide sulfurique concentré agissant sur les essences donne généralement une coloration jaune passant au brun, puis au violet; avec les résines la coloration peut être rouge ou jaune [22]; avec certains glucosides (salicine, amygdaline) on obtient une coloration rouge foncé [108].

frais dans une solution de digitonine à 1 p. 100 dans l'alcool à 35 p. 100. Après un séjour d'une semaine, on coupe à congélation; le montage s'effectue dans la glycérine gélatinée. Avec l'appareil à polarisation on voit les cristaux aciculaires isolés ou groupés en étoiles. Si l'on traite préalablement les pièces à l'éther éthylique, les préparations se montrent optiquement vides [48]. Nous pouvons ajouter qu'après fixation préalable du tissu par le mélange chromo-osmique ou par le liquide de Regaud on ne peut plus déceler la présence de stérol par la digitonine.

Le pouvoir biréfringent du complexe stérol-digitonine ne se manifeste que dans le cas d'une précipitation lente dans des solutions alcooliques diluées. A l'état amorphe, il perd ses propriétés. Des saponines différentes de la digitonine donneraient des résultats meilleurs : par exemple le gaiac saponine forme avec le cholestérol des cristaux volumineux et d'une structure cristalline très nette qui rend impossible une confusion avec les éthers cholestéroliques [49]. Cependant le complexe saponine-cholestérol paraît moins stable que le complexe digitonine-cholestérol [58 et 87].

Les stérides, esters (éthers-sels) de stérols prennent, sous l'action de l'acide sulfurique concentré et de l'anhydride acétique, les mêmes colorations que les stérols. Cependant on obtient parfois des résultats négatifs pour certains mélanges, aussi est-il nécessaire de répéter les essais.

Les esters des stérols ne présentent aucun changement dans la solution alcoolique de digitonine. Nous avons pourtant obtenu des cristaux du complexe stérol-digitonine dans les tissus contenant seulement des stérides en opérant d'abord, sous l'effet d'une élévation de température, l'hydrolyse de ces stérides pour mettre en liberté le phytostérol. Nous plaçons des lambeaux de tissu frais, montés dans l'eau entre lame et lamelle, dans une boîte de Pétri qui contient également un godet rempli d'eau. Nous portons le tout dans l'étuve à une température et pendant un temps suffisants pour que les corps lipidiques étudiés se trouvent complètement désagrégés, par exemple à 59 degrés pendant une demi-heure, à 57 degrés pendant 4 h. 30. Nous plaçons alors les lambeaux de tissu dans la solution de digitonine à 1 p. 100 dans l'alcool à 40 degrés et nous obtenons, au bout de plusieurs jours, des cristaux du complexe digitonine-stérol quand les corps étudiés renferment des stérides.

Caractères particuliers des phospholipides.

Comme les stérides, les phosphoaminolipides se présentent sous forme soit de gouttelettes liquides isotropes, soit de gouttelettes biréfringentes présentant une croix noire en lumière polarisée. Mais

on les observe plus rarement que les stérides à l'état de cristaux solides aciculés.

Insolubles dans l'eau, les phospholipides donnent cependant, avec la plus grande facilité, des émulsions ou des solutions colloïdales. A l'état pur ils sont insolubles dans l'acétone, mais lorsqu'ils se trouvent mélangés avec d'autres corps gras, ils passent très aisément en solution dans l'acétone avec ceux-ci [51].

Traités par des solutions alcalines concentrées ou même simplement montés dans l'eau, les phospholipides se gonflent et donnent naissance à des figures myéliniques. Ces figures myéliniques sont très généralement biréfringentes. En montant le tissu frais dans l'eau, entre lame et lamelle, dans une boîte de Pétri placée dans l'étuve, nous avons observé qu'au bout d'un temps assez court, les corps de nature phospholipidique peuvent former des figures myéliniques, par exemple au bout d'une demi-heure à 55 degrés. Nous déterminons également, dans certains cas, la formation de figures myéliniques par action du réactif iodo-ioduré très concentré.

Les phospholipides étant très facilement hydrolysés ou oxydés, il ne faut opérer que des fixations très courtes. Il est même recommandé d'étudier ces corps sans fixation préalable.

L'action de l'acide sulfurique concentré permet de distinguer nettement les phospholipides des stérides. Nous constatons d'abord qu'une solution alcoolique de lécithine (pure, du commerce) ne précipite pas quand on l'additionne d'acide sulfurique concentré. Nous ajoutons alors de l'eau, en refroidissant pour éviter de carboniser le précipité qui se forme. Ce précipité peut être, après filtration, redissous dans l'alcool. D'autre part, l'acide sulfurique concentré agissant directement sur de la lécithine *in vitro* donne une liqueur rouge. Par addition d'eau ou neutralisation nous pouvons isoler la lécithine, au moins en partie hydrolysée, et constater qu'elle est encore très soluble dans l'alcool.

La réaction de Smith Dietrich utilise, pour mettre en évidence les phospholipides, la propriété que présentent ces corps de former un composé chromé quand on les traite par une solution de bichromate de potassium; ce composé chromé est secondairement mis en évidence par l'hématoxyline qui forme une laque noire résistant à l'action du différenciateur de Weigert. On coupe à congélation le matériel formolé, on traite pendant deux jours à 37 degrés par une solution de bichromate de potassium à 5 p. 100, puis on lave à fond à l'eau distillée renouvelée. On colore alors avec l'hématoxyline de Kultschitzky (10 cc. d'hématoxyline à 10 p. 100 dans l'alcool absolu, mûrie au moins pendant six mois + 90 cc. d'eau acétique à 2 p. 100). Après lavage, on différencie avec le mélange de Weigert (2,5 g. de ferri-cyanure de potassium + 2 g. de borate de sodium + 100 cc. d'eau). On lave soigneusement, puis on monte dans la glycérine gélatinée,

le sirop de lévulose ou le sirop d'Apathy. Une coloration noire foncée peut seule caractériser les phospholipides, un très grand nombre de substances différentes, en effet, se teignent en gris bleu. Quand on obtient une coloration noire foncée on peut donc être assuré de la présence de phospholipides, cependant un léger doute subsiste si les corps étudiés renferment des stérides ou des stérols. Un résultat négatif ne prouve pas l'absence de phospholipides, car il arrive fréquemment que des mélanges en renfermant ne donnent pas la réaction de Dietrich [51].

ROMIEU a signalé que la lécithine se colore en brun acajou par l'iodo-iodure de potassium. L'action de la chaleur sèche, de l'eau bouillante, de l'acide chlorhydrique étendu, de l'eau de brome ou de l'un quelconque des agents déterminant un certain degré de décomposition de la lécithine, renforce son affinité pour l'iode, alors que la plupart de ces agents ont un effet inverse quand il s'agit du glycogène. De plus, la teinte acajou obtenue avec la lécithine en solution alcoolique ne disparaît pas par la chaleur, contrairement à ce qui se produit pour le glycogène en solution aqueuse. Il se forme, probablement, une iodo-choline instable, soluble dans la lécithine et insoluble dans le réactif iodé. La réaction serait donnée aussi bien par la lécithine libre que par la lécithine combinée. On se débarrasse du glycogène en utilisant la solubilité de ce corps dans l'eau chaude [89 et 90].

D'après LOISEL, la lécithine se différencie des graisses neutres par les colorations qu'elle donne seule avec l'hématoxyline, le violet de gentiane, le vert de méthyle, le bleu de toluidine, la fuchsine acide et l'orange G [53]. Avec le rouge de ruthénium nous avons pu nous-même observer très nettement la coloration des figures myéliniques (obtenues sous lamelle en montant une très petite quantité de lécithine dans une goutte de la solution aqueuse de ce colorant habituel des mucilages) tandis que les gouttelettes d'huile de Ricin restent, dans le même colorant, parfaitement incolores.

LES CONCRÉTIONS LIPIDIQUES INTRAVACUOLAIRES

BULBES DE LIS

Historique.

« L'épiderme des écailles bulbaires du Lis blanc présente une particularité qui semble avoir passé inaperçue jusqu'à ce jour et constituer, dans les végétaux, un fait encore inobservé. » C'est en ces termes que Marcel MIRANDE commence l'exposé de la première partie de son travail [65]. L'auteur montre, en effet, que la plupart des cellules de cet épiderme contiennent de volumineuses sphères réfringentes, dépassant souvent $30\ \mu$ de diamètre. Le plus souvent il n'y a qu'une sphère par cellule, mais il n'est pas rare d'en trouver plusieurs. Chacune de ces sphères présente un corps central réfringent entouré par un manteau plus ou moins épais et de réfringence moindre.

MIRANDE, voyant dans ces corps des plastes élaborateurs (stérionoplastes), explique la formation de sphéro-cristaux de la façon suivante. Sous des influences encore peu précisées on voit ces organites subir des transformations intéressantes : le corps central se transforme en un sphéro-cristal de fines aiguilles. « Mais un autre phénomène plus remarquable se produit : l'organite avant de cristalliser lui-même et même, semble-t-il, sans jamais cristalliser, est un appareil élaborateur de cristaux de tailles diverses qui finissent par se disséminer dans toute la cellule. La sphère opère ainsi, sur sa périphérie, aux dépens de sa masse centrale, un bourgeonnement multiple dont chaque bourgeon donne naissance à un radiocristal. Souvent les radiocristaux sont déjà formés et entourés encore du manteau avant de se détacher du globule. En un mot la sphère expulse hors d'elle-même de véritables calculs ».

Ces organites se colorent sous l'action des colorants dits vitaux (bleu de crésyl, rouge neutre, etc...) rapidement et avec intensité ainsi que sous l'action du rouge de ruthénium. La masse centrale est toujours colorée avec plus d'intensité que le manteau. « Les sphéroïdes sont insolubles dans l'eau et n'y subissent à froid ni changement ni déformation. Mais à l'ébullition, ils se transforment, presque instantanément, et aux dépens de leur masse centrale, en grosses boules d'aspect grisâtre, complètement bourrées d'une poussière de fins cristaux. Si l'ébullition dure plusieurs minutes, l'amas cristallin devient très volumineux, ne reste plus sphérique et même arrive à occuper une grande place dans la cellule ». Ces organites sont rapidement dissous par l'alcool ordinaire et par les alcools méthylique et amylique;

solubles également dans l'acide acétique, l'éther, le chloroforme, l'acétone, les acides concentrés (sulfurique, chlorhydrique). Par action du nitrate d'argent ammoniacal, en chauffant jusqu'à l'ébullition, les sphéroïdes réfringents se transforment en boules uniformes, finement granuleuses (probablement microcristallines) fortement colorées en rouge brun foncé. L'action des dissolvants ci-dessus, surtout, montre que ces organites sont en grande partie de nature lipoïde. « Comme tels ils jouissent de la propriété d'être insolubilisés par certains sels de métaux lourds : réaction à l'argent ci-dessus, action du fixateur mitochondrial de Regaud (formol et bichromate de potasse). L'action du formol seul produit une sorte de coagulation qui met en lumière des détails de structure. Lentement osmio-réducteurs, l'acide osmique les fixe et les insolubilise ».

Et MIRANDE termine cette étude par la conclusion suivante : « ces organites sont élaborateurs au sens propre du mot : sans diminuer de volume, par suite, au moyen d'apports extérieurs, ils produisent un volume de calculs bien supérieur au leur propre, et ensuite, à l'ébullition, ils fournissent encore une masse cristalline aussi volumineuse que celle fournie, par le même moyen, par des organites à l'état de repos ».

MIRANDE précise alors la nature protéo-lipoïdique de ces stérinoplastes qu'il vient de découvrir dans le Lis blanc [66]. Le manteau de ces organites est en partie formé de matière protéique. « Déjà, sans réactif, avec un peu d'attention, on peut constater que le manteau est bordé, extérieurement, par une mince zone finement granuleuse. Assez souvent on peut discerner, dans le reste de l'épaisseur du manteau, des stries concentriques plus ou moins ondulées. Divers agents (acides dilués, potasse, formol, etc...) font apparaître clairement la pellicule externe du manteau, la structure granuleuse des stries et souvent une pellicule de même structure, mais plus dense, bordant le manteau, à l'intérieur, contre la masse centrale ».

Sous l'influence de l'alcool ou de quelque autre solvant des matières lipoïdes, la gangue lipoïde de la couche interne du manteau est dissoute, les stries granuleuses protéiques de cette couche sont disloquées et seule demeure intacte la pellicule externe que le bleu d'aniline colore en bleu et l'iode en jaune. Par la réaction de Guesda (sulfate de nickel et ammoniacque) le manteau se colore en jaune; il s'élargit en gonflant légèrement, montre ses granulations colorées en jaune clair et la pellicule externe en jaune plus vif. La réaction d'Axenfeld (chlorure d'or au millième et une goutte d'acide formique) colore le manteau en rouge. Dans les deux cas, après lavage à l'eau et passage de l'alcool, il ne reste plus que la pellicule externe, insoluble et toujours colorée.

En résumé, dit MIRANDE, « le corps central des stérinoplastes est de nature lipoïde; le manteau est constitué par une couche externe mince uniquement protéique, et une couche interne plus épaisse, formée

de matière protéique en stries concentriques granuleuses unies par de la matière lipide; il est limité, à l'intérieur, par une mince pellicule granuleuse plus dense, mais également, semble-t-il, protéolipoïdique. Toute la couche interne est disloquée par dissolution de la gangue lipide et ses débris protéiques restent au sein de la pellicule externe essentiellement protéique et qui reste intacte ».

Pour fixer la nature de la « sécrétion des stérinoplastes » du Lis blanc [67] MIRANDE effectue les réactions colorées de la cholestérine. Il examine d'abord des stérinoplastes isolés sur frottis : « avec une aiguille triangulaire on frotte très légèrement la surface d'une écaille et l'on dépose sur la lame porte-objet le suc ainsi extrait qui contient, avec des grains d'amidon provenant de l'assise sous-épidermique, de nombreux stérinoplastes ». On peut appliquer la plupart des réactions colorées de la cholestérine. « La réaction de Heintz (acide sulfurique) qui donne avec la cholestérine une coloration rouge sang, mieux encore celle de Liebermann (acide sulfurique et anhydride acétique) à coloration rouge carmin, en ayant soin de ne pas employer un excès de réactif, donnent un très bon résultat ». MIRANDE effectue ensuite les réactions de la cholestérine sur les cellules épidermiques mêmes des écailles bulbaires. Mais, dans ce cas, la réaction colorée s'opère en masse au sein de la cellule. Au moment de leur pénétration dans la cellule « les réactifs se mélangeant avec l'eau cellulaire » ne seraient plus assez concentrés pour produire la réaction, mais le seraient suffisamment pour dissoudre les stérinoplastes avec une grande rapidité. Un instant après, la concentration étant redevenue suffisante, la réaction générale se produit. Sous l'action de l'acide sulfurique concentré (réaction de Heintz) le protoplasme tout entier se colore en rouge sang ou pourpre, puis la coloration diffuse dans tout le liquide. « Si, à l'acide sulfurique, on ajoute un peu d'anhydride acétique (réaction de Liebermann) on obtient une coloration rouge carmin; en outre, de nombreuses gouttelettes d'anhydride tenant la phytostérine en dissolution et colorées en rouge se répandent dans toute la préparation. En traitant par le chloroforme et l'acide sulfurique (réaction de Hesse), coloration rouge et gouttelettes de chloroforme colorées en rouge carmin. De l'acide trichloracétique fondu et une goutte d'acide chlorhydrique (réaction de Hirschsohn) donnent, à une douce chaleur, une coloration rose. Des épidermes ayant séjourné peu de temps dans l'alcool, le chloroforme, l'acide acétique, ne donnent plus les réactions ci-dessus. Par contre, ce sont les résidus laissés par ces solvants, évaporés sur lame ou verre de montre, qui les donnent ».

MIRANDE rappelle que « les cholestérines végétales sont très répandues. On en a isolé d'organes et de produits les plus divers; toutes ces phytostérines sont des substances extraites et étudiées purement au point de vue chimique. Pour la première fois, dans le Lis blanc, nous voyons un organite élaborateur de stérine et finissant par la

déposer, parfois, dans la cellule, à l'état figuré. On est autorisé à penser que ce cas ne doit pas être isolé et ces observations sur le Lis blanc ouvrent le champ à des recherches cytologiques nouvelles sur la question des phytostérines dont la grande fréquence est indicatrice d'un rôle physiologique important ».

MIRANDE a ensuite suivi les états de la « liliostérine » au cours de la vie des écailles bulbaires du Lis blanc [68]. Abandonnées simplement à l'air libre, les écailles détachées d'un bulbe, très charnues à l'état frais, se vident et se dessèchent lentement et ce n'est qu'au bout de plusieurs mois et même de plus d'un an qu'elles arrivent à dessiccation complète. On constate alors que les cellules flétries sont réduites à leur membrane cellulosique, sauf celles de l'épiderme qui se montrent remplies de liliostérine et uniquement de cette substance sous deux formes que MIRANDE décrit sans préjuger encore du lien qu'elles peuvent avoir entre elles.

D'abord, dans la plupart des cellules épidermiques des écailles desséchées, « on retrouve encore les stérinoplastes; le corps central est çà et là demeuré amorphe, ailleurs il a pris une fine structure radiée ou microcristalline; le manteau, le plus souvent, présente une structure fibreuse sous forme de fines stries parallèles; parfois le stérinoplaste est transformé en un fil ténu de stérine enroulé transversalement en un peloton très serré avec, au centre, une masse plus ou moins amorphe. En outre, les cellules épidermiques sont entièrement remplies par un bloc concrétionné de liliostérine qui affecte des formes assez diverses : masses mamelonnées, comme formées de nombreuses boules irrégulières intimement accolées; masse d'aspect mésentéroïde comme formée de cordons soudés entre eux, parfois plus ou moins libres; d'autre fois la masse est constituée par un fin chevelu de stérine plus ou moins ondulé et frisé. Cette forme capillaire constitue même la structure intime de tous ces amas. En effet, si cette structure n'apparaît pas directement, il est facile de la mettre en lumière : parfois il suffit de porter l'épiderme rapidement à l'ébullition dans l'eau; ou bien l'on traite l'épiderme, sous le microscope, par l'action ménagée d'un solvant de la stérine comme l'alcool; sous l'action de ce liquide, la liliostérine (stérinoplastes et blocs concrétionnés) se dissout et la cellule se montre alors complètement vide, mais avant la dissolution, dès l'attaque du réactif, on voit apparaître la structure finement capillaire des blocs concrétionnés ».

Ayant ainsi étudié les effets produits par la dessiccation sur les écailles isolées du bulbe de *L. candidum*, MIRANDE retrouve dans les écailles qui se dessèchent normalement dans le sol, à la périphérie du bulbe, la plupart du temps, les mêmes phénomènes. « Sous l'influence naturelle ou provoquée du froid, se produisent aussi des concrétions stériniques et la transformation variée des stérinoplastes. Pendant l'hiver, il arrive que des écailles périphériques des bulbes, qui parfois

affleurent à la surface du sol, subissent la gélivure, par places ou complètement. Aux points ainsi frappés, les écailles prennent une teinte feuille morte donnée par l'épiderme, presque décollé, et, dans tous les cas, facilement détachable de la partie charnue. Dans ces épidermes, les stérinoplastes sont transformés fréquemment en sphéro-cristaux finement aiguillés, ou disloqués en amas de radiocristaux, ou bien en gros radiocristaux creux au centre, ou encore en sorte de couronnes épaisses radialement craquelées ou striées. En outre, la cellule est, la plupart du temps, remplie de stérine concrétionnée, ou cristallisée en paquets de cristaux aiguillés, ou sous forme de blocs aplatis en tablettes craquelées ».

MIRANDE analyse ensuite les « propriétés optiques des stérinoplastes et de la phytostérine » des bulbes de Lis blanc [69]. Il arrive à cette conclusion que « les stérinoplastes normaux, les calculs produits par eux par bourgeonnement, les sphéro-cristaux en lesquels ils se transforment parfois, sont à biréfringence négative ». Ces stérinoplastes, dont on peut voir d'ailleurs fréquemment la structure en zones concentriques, ne sont donc pas des organites amorphes : « ils possèdent une structure physique analogue à celle des formes d'imbibition des cristaux liquides; structure qui appartient, comme on sait, aux graisses, aux substances lipoides auxquelles appartiennent les stérines. Les stérinoplastes concrétionnés et les blocs de stérine concrétionnée des écailles sèches, toutes formations qui ont une structure intime de couches fibrillaires, souvent visibles d'ailleurs, accusent une biréfringence positive. Cette stérine concrétionnée est très réfringente, ce qui est dû, certainement, à un état de deshydratation élevé. Cette stérine accuse donc, en puissance, une structure cristalline prismatique dont les éléments juxtaposés constituent les couches fibrillaires successives; ces éléments sont placés perpendiculairement aux couches et leurs faces d'allongement, dans ce sens, sont perpendiculaires à l'axe optique. Dans chaque quadrant ou zone équivalente, la direction de plus petite élasticité est radiale (perpendiculaire aux couches), la direction de plus grande élasticité est tangentielle (parallèle aux couches) ». D'après MIRANDE, l'aspect morphologique et les propriétés optiques montrent donc que la liliostérine se présente sous deux états différents qui correspondraient à deux états chimiques également différents.

Ayant ainsi étudié les stérinoplastes du Lis blanc, MIRANDE a étendu ses recherches à l'ensemble des espèces du genre *Lilium* [70]. Dans aucune des vingt espèces qu'il a ainsi examinées ce savant n'a pu retrouver de stérinoplastes. « Ces sortes d'organites semblent n'appartenir qu'au seul *Lilium candidum* qui, déjà se montre, parmi le genre, comme un type bien tranché par certains de ses caractères morphologiques et, notamment, par son mode bien spécial de végétation hivernale. Par contre, la phytostérine concrétionnée, à biré-

fringence positive, est très répandue dans le genre *Lilium* et semble y être générale. Cette stérine positive, répandue dans toutes les espèces, et qui ne coexiste avec les stérinoplastes que dans le *L. candidum*, semble donc bien, dans cette dernière espèce même, être sans relation avec les stérinoplastes ». Cette stérine est contenue, en dissolution, dans l'appareil vacuolaire général des cellules épidermiques et s'y dépose, souvent en grande abondance et dans les conditions décrites précédemment, en blocs concrétionnés de formes extrêmement variées; elle est présente d'assez bonne heure et, dans les épidermes d'écailles fraîches, où le dépôt concrétionné solide n'est pas encore effectué, on peut souvent le provoquer artificiellement, notamment sous l'action ménagée de l'eau chaude. « La production de cette stérine vacuolaire générale augmente avec l'âge des écailles et arrive à son maximum au moment de leur dessiccation ou de leur flétrissement, dans les circonstances naturelles ou artificielles, au point que, seule, cette substance, à l'état concrétionné, finit par remplir les cellules épidermiques lorsqu'elles sont mortes ».

En terminant l'exposé de son travail, MIRANDE formule quelques considérations générales. Dans les conditions naturelles, dans le sol, l'infestation des écailles par les microorganismes est rare et se borne à l'attaque partielle et superficielle par quelques filaments fongiques. Ainsi dans les bulbes de Lis, la phytostérine ne semblerait pas avoir un « rôle de réserve alimentaire », mais plutôt un « rôle de défense », elle semblerait aussi « protéger les écailles contre une trop rapide dessiccation ». Et MIRANDE de rappeler que les très nombreuses recherches dont la cholestérine animale a été l'objet, au cours des dernières années, tendent à prouver que cette substance joue aussi dans l'organisme un rôle de défense anti-infectieux, sa propriété hydrophile ayant été également mise en lumière.

MIRATON, dans ses recherches morphologiques sur le bulbe de Lis blanc [72], a vérifié l'existence des stérinoplastes, mais il s'est aperçu que ces corps étaient situés dans les vacuoles des cellules épidermiques. « Au cours de nos recherches sur le bulbe de Lis, dit-il, nous avons vu que les jeunes feuilles renferment déjà ces stérinoplastes sous forme de masses concrétionnées. Ils sont très nettement intravacuolaires. Ils apparaissent dans la vacuole comme s'y déposerait un cristal d'oxalate de chaux. »

Nous devons donc abandonner la conception édifiée par MIRANDE de « plastes élaborateurs de liliostérine », si, comme l'affirme MIRATON, ces « stérinoplastes » sont bien des corps concrétionnés dans les vacuoles (1). C'est dans cette direction que sont orientées nos recherches personnelles que nous allons maintenant exposer.

(1) L'élaboration des stérides peut être, d'ailleurs, réalisée dans de vrais plastes, comme l'ont montré les travaux de SAVELLI [93].

Étude morphologique.

Cette étude nous permet de préciser la signification des « stérionoplastes » de Marcel MIRANDE, en montrant qu'ils constituent simplement l'un des aspects que présentent les lipides concrétionnés dans les vacuoles des cellules épidermiques. Nous allons en même temps suivre, de la plus intérieure à la plus extérieure des écailles du bulbe de *Lilium candidum*, les formes diverses que présentent les concrétions lipidiques intravacuolaires.

Les plus petites écailles, situées tout à fait au centre du bulbe, ne mesurent que quelques millimètres de hauteur. Elles se trouvent complètement enveloppées par les écailles suivantes. Aussi sont-elles restées blanches tandis que les autres écailles du bulbe apparaissent colorées en rose par du pigment anthocyannique dans leur partie exposée à la lumière, comme l'a montré MIRANDE [64]. En prélevant sur ces petites écailles, avec une aiguille lancéolée, un lambeau d'épiderme pour le monter simplement dans une goutte d'eau entre lame et lamelle, nous constatons sous le microscope l'absence de tous corps figurés intravacuolaires. Le contenu condensé des jeunes vacuoles apparaît directement par différence de réfringence; il prend une coloration intense, vitalement, avec le rouge neutre en solution dans l'eau, mais il conserve toujours un aspect parfaitement homogène (Pl. I, 1, V.) Cependant, nous avons observé qu'accidentellement, dans cet épiderme, pouvaient apparaître les masses concrétionnées en pelotons, étudiées par MIRANDE dans les écailles périphériques desséchées. On trouve notamment au centre du bulbe des écailles pétioles, représentant la base des feuilles qui formaient une rosette à l'automne précédent [72]. La pointe de ces petites écailles est souvent un peu desséchée et nous pouvons constater que les cellules épidermiques sont alors remplies de blocs concrétionnés en pelotons, absolument comme si la dessiccation s'effectuait dans l'épiderme des écailles les plus extérieures du bulbe.

Nous trouvons ainsi, au centre du bulbe, un nombre variable de petites écailles dont les cellules épidermiques ne contiennent pas de corps concrétionnés dans leurs vacuoles, puis nous passons insensiblement dans les écailles plus extérieures à des cellules épidermiques dans lesquelles nous allons voir les concrétions intravacuolaires prendre de plus en plus d'importance. En colorant vitalement avec le rouge neutre ou le bleu brillant de crésyl les cellules épidermiques, nous constatons d'abord la présence de minuscules corps sphériques colorés plus intensément que le reste de la vacuole; ces corps en se réunissant constituent des concrétions lobées (Pl. I, 2, C.). On voit ainsi deux ou trois grains se souder en une masse qui tend à devenir sphérique. Parfois l'un de ces grains présente l'aspect sphéro-cristallin

qui caractérise les « calculs de phytostérine » décrits par MIRANDE. Toutes ces concrétions intravacuolaires sont d'ailleurs visibles sans coloration : elles apparaissent directement par différence de réfringence dans le suc vacuolaire moins condensé.

Dans les caïeux, nous avons également constaté que les écailles centrales ne présentent pas de corps concrétionnés dans les vacuoles de leurs cellules épidermiques. Même dans un très petit bulbe, ne mesurant pas plus de huit millimètres de hauteur, nous avons déjà constaté cette différenciation : l'écaille la plus intérieure présentait, dans ses cellules épidermiques, des vacuoles d'aspect homogène tandis que les trois autres écailles montraient dans leur épiderme des concrétions intravacuolaires de forme lobée.

Les écailles moyennes du bulbe sont les plus épaisses, leur mésophylle étant très riche en amidon. En rapport avec les conditions de la végétation souterraine ces écailles sont normalement blanches, mais, exposées à la lumière, elles prennent peu à peu une teinte rouge de plus en plus accentuée. Le pigment anthocyannique est alors localisé dans les cellules de l'assise sous épidermique [64]. Toujours en allant de l'intérieur vers l'extérieur du bulbe, nous constatons que, dans les vacuoles des cellules épidermiques, les concrétions deviennent régulièrement sphériques en même temps qu'elles augmentent de volume. Peu à peu, également, leur bord devient plus clair, constituant une couche périphérique qui réduit progressivement en grandeur absolue le diamètre du noyau. Ainsi se trouve réalisée, à ce stade de l'évolution des écailles du bulbe de *Lilium candidum*, la forme des « stérinoplastes » décrits par MIRANDE (Pl. I, 3, C.).

Dans les cellules épidermiques de ces écailles, nous avons constaté la présence de corps globuleux dont la taille augmente progressivement comme celle des concrétions intravacuolaires, mais qui ne présentent jamais de noyau. Ces globules que MIRANDE n'a pas distingués des « stérinoplastes » présentent cependant d'autres caractères très nets : ils apparaissent plus régulièrement sphériques, plus clairs que les concrétions intravacuolaires et, par coloration vitale des cellules épidermiques, ils se situent dans le cytoplasme (Pl. I, G.). D'autre part, ils se différencient des corps concrétionnés dans les vacuoles par leur solubilité dans l'éther et leur insolubilité dans l'acide acétique. Enfin, ils ne sont pas dissous par l'alcool et l'hydrate de chloral, ce qui permet, par la coloration avec le Soudan III, de constater directement leur nature lipidique. Ces corps correspondent donc simplement aux inclusions de glycérides que l'on trouve très généralement dans le cytoplasme des cellules végétales [30]. Au contraire, les concrétions intravacuolaires se dissolvent rapidement dans le Soudan III à l'alcool ou à l'hydrate de chloral sans que l'on observe jamais ainsi directement leur coloration. On voit également un de ces globules lipidiques inclus dans le cytoplasme de chaque cellule sous-épidermique alors que les

concrétions intravacuolaires sont rigoureusement localisées dans l'épiderme.

Les écailles plus extérieures du bulbe apparaissent particulièrement développées en largeur. Leur surface s'est ridée progressivement à mesure que les réserves amylacées étaient digérées dans le mésophylle. Dans les vacuoles des cellules épidermiques les concrétions ne présentent souvent plus de noyau, elles apparaissent alors sous forme de masses irrégulièrement sphériques d'aspect homogène (Pl. I, 4, C.). Parfois ces concrétions paraissent corrodées, présentant des sillons à leur surface, tout comme s'il s'agissait de grains d'amidon en voie de digestion. Cependant ces concrétions corrodées se colorent vitalement par le rouge neutre à l'intérieur des vacuoles et ne présentent pas de croix noire en lumière polarisée, ce qui ne permet aucune confusion avec l'amidon des tissus sous-épidermiques. C'est surtout dans ces écailles périphériques que l'on trouve les « calculs de phytostérine » signalés par MIRANDE : ces concrétions à structure cristalline rayonnée ne sont pas de vrais sphéro-cristaux car elles ne montrent pas de croix noire lorsqu'on les examine en lumière polarisée.

Les écailles les plus extérieures du bulbe sont à peu près complètement vidées de leur mésophylle riche en amidon et se réduisent ainsi progressivement à leur épiderme ridé. Nous trouvons alors dans les vacuoles des cellules épidermiques des concrétions sphériques qui prennent progressivement l'aspect des cordons pelotonnés décrits par MIRANDE. Dans chacune de ces sphères apparaît d'abord, sans qu'il y ait différence de réfringence, un noyau (Pl. I, 5, C.). Puis, la dissociation continuant, on voit se constituer une série de couches concentriques et l'on observe alors une croix noire en lumière polarisée (Pl. I, 5, C₂).

Ainsi, dans les écailles desséchées du bulbe de *L. candidum*, les concrétions intravacuolaires (stérinoplastes) prennent progressivement l'aspect des cordons pelotonnés (Pl. I, 5, C₃ et C₄). Parfois, plusieurs concrétions intravacuolaires se trouvent contenues dans la même cellule épidermique et constituent, après cette dissociation en couches concentriques, les divers blocs pelotonnés qui remplissent à peu près complètement la cellule. Mais, la plupart du temps, chaque cellule épidermique renferme une seule concrétion intravacuolaire. Tout à fait au début de la dessiccation des écailles, dans les lambeaux de tissu épidermique montés dans l'eau, nous constatons sous le microscope une réhydratation à peu près immédiate des cellules, mais de nombreux corps globuleux ou annelés apparaissent dans le vacuome à côté de la concrétion préexistante (Fig. I, 1). Signalons ici que dans les cellules épidermiques du Chou rouge en voie de dessiccation, ILJIN constate également la précipitation de nombreux corps globuleux intravacuolaires [46]. Quand les écailles du bulbe de *Lis blanc* sont plus desséchées, l'épiderme, également monté dans l'eau, présente

des concrétions plus volumineuses dissociées en couches concentriques (Fig. I, 2), les cellules épidermiques apparaissant finalement remplies de masses pelotonnées (Fig. I, 3).

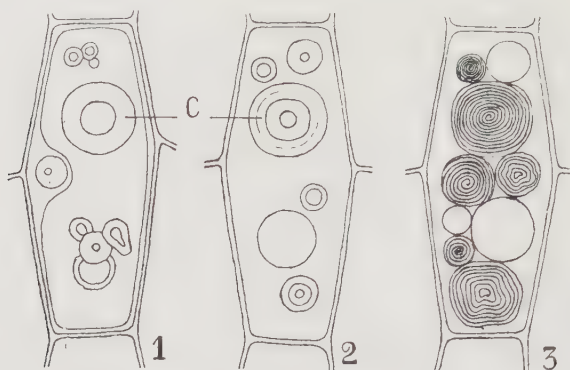


FIG. I. — Cellules épidermiques dans les écailles de plus en plus desséchées à la périphérie d'un bulbe de Lis blanc (*L. candidum*) :

1. à côté de la concrétion C préexistante apparaissent des corps globuleux ou annelés intravacuolaires;
2. concrétions présentant des stries concentriques;
3. masses pelotonnées remplissant la cellule.

Dans les autres espèces de Lis, comme l'a montré MIRANDE, aucun corps concrétionné n'existe dans l'épiderme des écailles fraîches, mais, sous l'effet de la dessiccation, apparaissent, comme dans le Lis blanc, des masses pelotonnées remplissant complètement les cellules épidermiques. Essayons de suivre, pour une espèce quelconque, *L. tigrinum* par exemple, les diverses étapes de cette transformation dans les écailles de plus en plus sèches. Prélevons des lambeaux d'épiderme et montons-les simplement dans l'eau. Quand la dessiccation est peu accentuée, les cellules épidermiques présentent dans leurs vacuoles un nombre croissant de corps granuleux ou annelés (Fig. II, 1). On obtient la même précipitation du vacuome en montant l'épiderme d'écailles non desséchées dans une solution hypertonique, la plasmolyse produisant, comme l'a montré GUILLIERMOND dans les feuilles d'*Iris*, l'apparition de nombreux corps globuleux intravacuolaires [29]. Mais, dans les écailles bulbaires en voie de dessiccation, le noyau et le cytoplasme sont rapidement détruits et nous suivons alors la précipitation des substances provenant du vacuome dans des cellules épidermiques mortes. D'autre part, comme le fait remarquer ILJIN, quand on monte dans l'eau le tissu préalablement desséché, les membranes cellulaires se gonflent rapidement tandis que le contenu des cellules, ne subissant pas une hydratation aussi rapide, reste au centre ou le plus souvent accolé à l'une des parois : c'est la pseudoplasmyse [46]. Nous constatons ici, en montant dans

l'eau l'épiderme des écailles bulbaires desséchées, la présence de masses concrétionnées au centre ou sur le côté des cellules. Ces masses subissent un gonflement progressif permettant de constater, avec une très grande netteté, l'apparition de figures myéliniques (Fig. II, 2) absolument analogues à celles que forme un globule de lécithine monté dans l'eau. Les cellules épidermiques des écailles les plus desséchées, situées tout à fait à la périphérie du bulbe, renferment des concrétions plus volumineuses dissociées en couches concentriques (Fig. II, 3) et constituant finalement des masses pelotonnées (Fig. II, 4).

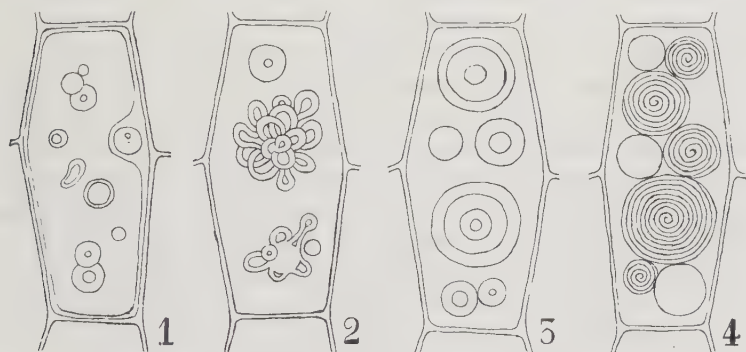


FIG. II. — Cellules épidermiques dans les écailles de plus en plus desséchées à la périphérie d'un bulbe de *L. tigrinum* :

1. apparition de corps globuleux ou annelés dans les vacuoles qui ne renfermaient auparavant aucune concrétion;
2. figures myéliniques (le tissu étant monté dans l'eau);
3. concrétions présentant des stries concentriques;
4. masses pelotonnées remplissant la cellule.

Cette formation de masses concrétionnées dans l'épiderme des écailles bulbaires desséchées de tous les *Lis* montre la consistance particulière du vacuome. Dans le bulbe de *L. candidum*, le suc vacuolaire, particulièrement concentré, se condense déjà en concrétions globuleuses dans les écailles normales, non encore desséchées. En suivant les écailles successives du bulbe, à partir de la plus intérieure, nous avons décrit les formes diverses que présentent ces concrétions, mais nous allons voir qu'il est possible de constater les modifications qui se produisent également dans toute l'étendue de la vacuole. Pour cela nous mesurons la vitesse de chute des concrétions intravacuolaires dans l'épiderme de diverses écailles. Rappelons que FREY a pu évaluer la viscosité du suc vacuolaire en mesurant la vitesse de chute des cristaux de gypse dans les vacuoles des Clostréries [23]. Il ne s'agit pas ici de rechercher un résultat du même ordre, les corps étudiés dans le bulbe de *Lis* n'ayant pas une densité connue, mais bien de comparer la vitesse de chute des concrétions intravacuolaires aux divers stades de leur évolution.

Quand on renverse assez rapidement le tube du microscope pour l'amener en position horizontale, la préparation se trouvant ainsi placée dans un plan vertical, on assiste au départ des concrétions qui, s'élevant dans le champ du microscope comme de petits ballons, tombent en réalité dans l'espace vacuolaire. Certaines concrétions restent cependant immobiles à la partie supérieure de la cellule qui se trouve en bas dans le champ du microscope : elles semblent adhérer au plafond de la vacuole. Elles se détachent parfois au bout d'un court instant et descendent alors en suivant l'une des parois latérales. Mais, le plus souvent, surtout si l'on prélève les lambeaux d'épiderme sur la partie moyenne des écailles afin d'opérer sur des cellules présentant le maximum de largeur, les concrétions tombent librement dans l'axe des vacuoles. On peut alors constater que le mouvement de chute, uniformément accéléré au départ, devient vite uniforme. De plus, les concrétions n'arrivent pas à la partie inférieure de la vacuole comme sur un plancher : leur mouvement est freiné en fin de chute et ce dernier résultat montre que la viscosité du suc vacuolaire doit augmenter progressivement pour passer à celle du cytoplasme. Les concrétions étant parvenues au bout de leur course, il suffit, le tube du microscope restant horizontal, de faire pivoter de 180° la platine tournante pour voir de nouveau les concrétions tomber dans les vacuoles. Cependant, au bout d'un temps excédant cinq minutes les concrétions s'immobilisent définitivement sans que, d'ailleurs, la coloration vitale au rouge neutre produise plus tôt cet arrêt.

Il est donc possible de mesurer la vitesse de chute de ces concrétions, en dehors de l'accélération au départ et du ralentissement à l'arrivée, dans la partie moyenne de la vacuole, en opérant sur des tissus épidermiques restés bien vivants entre lame et lamelle pendant plusieurs minutes, surtout si nous prenons la précaution de les monter dans le liquide de Ringer. Nous avons dans chaque cas mesuré la longueur L et la largeur l de la cellule, ainsi que le diamètre d de la concrétion. En effectuant trois mesures successives la moyenne des chiffres obtenus nous a donné le temps t que la concrétion met pour parcourir deux divisions du micromètre oculaire, soit $35\ \mu$. Les résultats obtenus ainsi sont exprimés dans le tableau suivant : les distances en microns et les temps en secondes.

L	l	d	t
50	35	9	52
140	60	18	20
150	70	25	15
130	110	20	9
140	110	18	9

Les concrétions intravacuolaires tombent donc avec une vitesse d'autant plus grande que l'on étudie l'épiderme d'écailles plus extérieures dans le bulbe. Nous avons, cependant, effectué nos mesures sur des concrétions dont le diamètre restait le plus possible constant et ne variait pas, en tout cas, régulièrement dans le même sens que la vitesse. Les résultats obtenus mettent surtout en cause une diminution de la viscosité du suc vacuolaire, à mesure que croît la taille des cellules, dans l'épiderme des écailles successives. On constate une dilution progressive du vacuome et c'est en même temps que les concrétions intravacuolaires s'enveloppent d'un manteau qui paraît correspondre à une zone d'hydratation périphérique (Pl. I, 3, C.). Le phénomène inverse se produit quand les écailles se dessèchent à la périphérie du bulbe : la différence de réfringence entre le noyau et le manteau disparaît peu à peu et l'on observe alors une structure homogène des concrétions (Pl. I, 4, C.). La déshydratation progressive, qui se produit ainsi dans les écailles périphériques en voie de dessiccation, nous donne finalement, quelle que soit l'espèce étudiée, les mêmes corps globuleux pelotonnés, pouvant présenter une croix noire en lumière polarisée. Ce phénomène optique et la présence de stries concentriques (Pl. I, 5, C.) probablement dues à l'existence de couches plus ou moins hydratées, rappellent la structure des grains d'amidon (1).

Nous pouvons conclure cette étude en affirmant que les masses concrétionnées dans les vacuoles des cellules épidermiques dans les écailles du bulbe de *Lilium candidum* présentent des formes diverses en relation avec les changements d'état physique du vacuome.

Étude histochimique.

Comme nous venons de le voir, les changements dans l'état d'hydratation du suc vacuolaire permettent d'expliquer les formes diverses que présentent les concrétions, dans l'épiderme des écailles successives du bulbe de *Lilium candidum*. C'est ainsi que nous avons vu, dans l'épiderme des écailles en voie de dessiccation, les concrétions intravacuolaires se diviser progressivement en un nombre croissant de couches concentriques, les préparations étant montées dans l'eau (Pl. I, 5). La même dissociation se produit quand on monte l'épiderme des écailles non desséchées dans la potasse, les acides minéraux étendus ou dans le formol et nous constatons que ces réactifs dissolvent pro-

(1) Cette convergence de formes est d'autant plus remarquable qu'elle ne résulte nullement du mode de formation. Les concrétions étudiées ici proviennent de la précipitation des colloïdes intravacuolaires et de l'agglomération des précipités. Au contraire, dans les grains d'amidon, la croissance paraît se faire toujours par intussusception et jamais par apposition à la surface du grain [76].

gressivement les concrétions après les avoir ainsi dissociées (1). Nous n'avons donc pas besoin pour expliquer cette dissociation d'envisager, comme le faisait MIRANDE, une série de couches protéiques interstratifiées dans le « stérinoplaste ». Nous avons, d'ailleurs, vérifié la présence constante d'une pellicule protéique enveloppant chaque concrétion intravacuolaire, mais nous n'avons jamais trouvé à l'intérieur de cette pellicule les granulations de matière protéique disposées en stries concentriques qui, d'après MIRANDE, seraient unies par une gangue de matière lipidique. La pellicule doit cependant correspondre à une condensation en surface, véritable coagulation superficielle [16], de substances existant dans la masse même des concrétions, mais la proportion des protides est probablement trop faible pour que l'on puisse les caractériser microchimiquement. Cette explication est d'autant plus vraisemblable que nous trouverons des concrétions intravacuolaires présentant nettement, dans toute leurs masse, les caractères des corps protéiques dans la fleur de *Lilium longiflorum Harrisii*.

La pellicule protéique enveloppant les concrétions intravacuolaires présente les caractères physiques des membranes d'albumine : rigidité, élasticité et insolubilité [13]. Quand on introduit de l'alcool sous la lamelle on voit les concrétions intravacuolaires se dissoudre, ne laissant subsister que la pellicule dont elles étaient enveloppées. D'autre part, le réactif iodo-ioduré faiblement concentré colore les concrétions en jaune paille et produit souvent un décollement de la pellicule qui apparaît alors colorée en brun noir. Nous avons vérifié que les réactions d'Axenfeld et de Guesda employées par MIRANDE permettent de colorer cette pellicule. La méthode de Derrien et Turchini [12] consiste à placer le tissu pendant 15 à 20 minutes dans une solution de tanin au dixième dans de l'eau contenant 30 p. 100 d'acide acétique. On lave à l'eau distillée, puis on traite par une solution diluée de perchlorure de fer. De l'encre se forme dans les corps de nature albuminoïde qui, seuls, ont retenu le tanin. En appliquant cette méthode nous avons teint en noir la pellicule enveloppant chaque concrétion restée incolore. Enfin la nature protéique de cette pellicule se trouve définitivement confirmée par la coloration rouge que nous avons obtenue avec le réactif de Millon.

Nous voyons donc, par addition d'alcool sous la lamelle, la pellicule protéique subsister seule, la totalité de la concrétion se dissolvant immédiatement. La solubilité des concrétions intravacuolaires dans l'alcool est, en effet, très grande : dans l'alcool à 30 p. 100 la dissolution est complète au bout d'un quart d'heure, dans l'alcool à 9 p. 100 les concrétions ne sont pas conservées au delà de cinq jours. Les

(1) Dans l'épiderme des écailles les plus jeunes du bulbe il suffit de dix minutes pour que le formol ait complètement dissous les concrétions intravacuolaires.

concrétions intravacuolaires sont aussi très solubles dans l'acide acétique et dans l'hydrate de chloral; elles se dissolvent dans l'acétone, la benzine, le chloroforme, l'éther acétique, l'acide phénique et les acides forts concentrés (SO_4H_2 , NO_3H , ClH). Elles se sont montrées insolubles dans tous les autres solvants employés. Tout d'abord, contrairement à l'affirmation de MIRANDE, les concrétions (stérinoplastes) sont pratiquement insolubles dans l'éther : après avoir séjourné pendant trois jours dans l'éther éthylique les lambeaux d'épiderme montrent encore des concrétions intravacuolaires dont le noyau présente souvent une structure cristalline. Nous avons également constaté leur insolubilité dans l'éther de pétrole, l'acide formique, le xylol et le toluène. On peut trouver remarquable l'insolubilité dans l'éther de ces corps dont nous vérifierons la nature lipidique, cependant, mentionnons ici que MERZ a constaté la présence de lécithine insoluble dans l'éther, dans le cerveau [61]. D'autre part, ces concrétions baignent dans la solution aqueuse colloïdale intravacuolaire et nous les avons même vues s'envelopper progressivement d'un manteau qui paraît correspondre à une zone d'hydratation périphérique. Or, comme nous le verrons plus loin en étudiant les propriétés de la solution aqueuse de cette substance, la lécithine, même en présence d'une très petite quantité d'eau, n'est plus soluble dans l'éther.

Les concrétions intravacuolaires se colorent, comme les substances mucilagineuses, par le rouge de ruthénium, le bleu coton, l'hématoxyline de Delafield, le rouge neutre à l'alcool et le bleu de méthylène. Cependant les caractères de solubilité que nous venons d'étudier nous montrent déjà que ces concrétions ne sont pas essentiellement constituées par des mucilages (1). Elles ne sont pas non plus constituées par des tannoïdes (absence de coloration par les sels ferriques, l'acide chromique...), ni par des glucides (la réaction de Molisch et les réactions des sucres réducteurs sont négatives). Dans ces conditions, la coloration rouge intense que prennent, à peu près immédiatement, les concrétions intravacuolaires dans le tissu épidermique frais, monté sous lamelle dans une goutte du réactif de Schiff incolore, peut être attribuée à la présence des lipides que nous allons maintenant étudier très attentivement.

MIRANDE a considéré ces corps comme des lipides : ils réduisent en effet l'acide osmique et se colorent par le bleu d'indophénol naissant. Mais on n'avait pu jusqu'ici réussir à les colorer par le Soudan III à l'alcool ou à l'hydrate de chloral qui les dissout sans que l'on observe jamais leur coloration. Même en opérant sous lamelle, avec beaucoup de ménagements, on ne voit aucun « stérinoplaste » se colorer avant de se dissoudre : les globules gras du cytoplasme apparaissent seuls colorés. Nous avons cependant obtenu la coloration par le Soudan

(1) On a trouvé, cependant, des mucilages solubles dans l'alcool [1].

des concrétions intravacuolaires présentant leurs formes caractéristiques : contour irrégulièrement sphérique, noyau et manteau ou cordons pelotonnés. C'est qu'en opérant avec une petite quantité de teinture d'Alkanna, au fond d'un verre de montre, nous avons observé que la dissolution des concrétions, dans les épidermes placés dans ce réactif, était de plus en plus lente et qu'au bout d'un certain temps subsistaient quelques « stérinoplastes » colorés en rouge vif. Nous avons immédiatement entrepris la même opération avec du Soudan III dissous à saturation dans de l'alcool à 70 degrés. Quelques gouttes de ce colorant, placées au fond d'un verre de montre, dissolvent les concrétions intravacuolaires dans un grand nombre de lambeaux d'épidermes prélevés sur une série d'écailles bulbaires. Puis cette dissolution se ralentit et, finalement, nous obtenons une coloration jaune orangé des concrétions intravacuolaires devenues insolubles dans le réactif qui s'est, par conséquent, saturé de leur substance. Il s'établit ainsi un coefficient de partage du Soudan entre la solution alcoolique saturée de lipides et ces mêmes lipides constituant les concrétions : le Soudan étant fixé plus intensément par les lipides concrétionnés que par leur solution alcoolique saturée.

Une simplification importante de notre méthode serait de saturer d'emblée la solution alcoolique du Soudan III avec des lipides déterminés. C'est ainsi que nous avons fait dissoudre à saturation de la cholestérine dans le Soudan à l'alcool, mais nous avons vainement essayé ensuite d'obtenir, avec ce réactif, la coloration des lipides concrétionnés dans les vacuoles. Par contre, la solution alcoolique du Soudan nous a permis d'obtenir cette coloration quand nous l'avons saturée de lécithine (pure, du commerce). Avec cette substance, on n'empêche pas complètement le Soudan à l'alcool de dissoudre les concrétions intravacuolaires, mais on ralentit suffisamment cette dissolution pour que l'on puisse, en faisant pénétrer le colorant sous la lamelle, observer des concrétions colorées. On obtient un résultat semblable en utilisant, sous lamelle, le Soudan III en dissolution dans la diacétine : la plupart des concrétions intravacuolaires se dissolvent, mais quelques-unes d'entre elles peuvent subsister, et présentent alors une teinte rose. Les concrétions ne se dissolvent plus que lentement et se trouvent également colorées dans les lambeaux d'épiderme que nous plaçons, d'abord pendant quelques minutes dans un mélange de bichromate de potassium à 3 p. 100 et d'eau oxygénée (dégagement rapide d'oxygène), puis que nous traitons ensuite sous lamelle par la solution alcoolique à 70 degrés du Soudan III. Enfin, le procédé de Zweibaum nous a donné une dernière preuve de la nature lipidique de ces concrétions. Après fixation par le mélange chromosmique pendant 24 heures, on colore avec le Soudan III à l'alcool. Ici encore on ne conserve pas toutes les concrétions; il faut même faire agir le Soudan alcoolique sous lamelle pour éviter une

dissolution complète. Dans ces conditions, on obtient une coloration rouge écarlate des concrétions intravacuolaires, alors que les globules lipidiques du cytoplasme apparaissent colorés en rouge brun. Cette différence de teinte est due à l'intensité plus ou moins grande du noircissement par l'acide osmique : cette intensité étant plus faible pour les concrétions intravacuolaires que pour les globules gras du cytoplasme. On observe d'ailleurs également une différence de coloration entre ces deux catégories de corps par le bleu d'indophénol : les concrétions intravacuolaires se teignent en bleu alors que les globules du cytoplasme apparaissent colorés en violet.

Pour obtenir la coloration par le Soudan III, on peut donc ralentir notablement la dissolution des concrétions dans l'alcool en y faisant dissoudre préalablement de la lécithine. C'est que les concrétions intravacuolaires doivent être, au moins en partie, constituées par des phospholipides. Rappelons ici que nous avons vu dans les écailles en voie de dessiccation le suc vacuolaire des cellules épidermiques se concrétionner en présentant des figures myéliniques (Fig. II). Nous retrouvons ces mêmes figures, semblables à celles que donne la lécithine montée dans l'eau, en faisant agir le réactif iodo-ioduré concentré sur l'épiderme des écailles non desséchées. Ce réactif concentré étant introduit progressivement sous la lamelle, les concrétions lipidiques intravacuolaires se teignent d'abord en jaune très clair et la teinte s'étend parfois à toute la vacuole, légèrement contractée, dans quelques cellules épidermiques. La coloration s'accroît ensuite et des cordons myéliniformes apparaissent dans les vacuoles autour des concrétions globuleuses, tous ces corps se trouvant colorés en jaune brun. Cette coloration jaune brun que prennent les concrétions intravacuolaires correspond à la réaction iodophile que donne la lécithine, d'après ROMIEU. Nous avons également obtenu la coloration des concrétions intravacuolaires avec la fuchsine acide, le vert de méthyle, le violet de gentiane et l'orange G, colorants qui, d'après LOISEL, teignent particulièrement la lécithine. Enfin la méthode de Smith-Diétrich permet de caractériser les phospholipides par coloration avec l'hématoxyline acétique et différenciation avec le mélange de Weigert. En traitant, suivant cette méthode, des lambeaux d'épiderme ou des coupes, obtenues avec le microtome à congélation sur les écailles bulbaires, les concrétions prennent la teinte noire caractéristique des phospholipides.

Les concrétions intravacuolaires présentent donc les caractères des phospholipides; comme elles sont très solubles dans l'alcool nous allons pouvoir étudier maintenant les propriétés de leur solution alcoolique. Utilisons simplement pour cela de l'alcool à 70 degrés, concentration suffisante pour dissoudre les concrétions intravacuolaires et qui risque bien moins d'entraîner en dissolution une quantité notable des autres constituants cellulaires. Triturons dans cet alcool

étendu des lambeaux d'épiderme prélevés sur un grand nombre d'écaillés. Nous obtenons, après filtration, une liqueur dont le résidu, obtenu par évaporation à sec, apparaît, en petite quantité, sous le microscope, constitué par des gouttelettes d'une substance blanche résineuse non cristallisée et, en plus grande quantité, se montre coloré en jaune brun (avec le même aspect que présente la lécithine incomplètement purifiée extraite de l'œuf). Une petite quantité de cette substance étant montée dans une goutte d'eau, sous lamelle, nous observons, sous le microscope, la formation de figures myéliniques identiques à celles que donne, dans les mêmes conditions, la lécithine (pure, du commerce).

La nature phospholipidique des concrétions intravacuolaires que nous venons ainsi de préciser s'accorde, d'autre part, avec les résultats que nous allons obtenir par action des alcalis et des acides. La potasse à 10 p. 100 dissout les concrétions intravacuolaires et cette dissolution est complète au bout de 16 heures, on n'observe plus alors que des pellicules vidées de leur contenu. En montant un lambeau d'épiderme sous lamelle, dans de la potasse et de l'ammoniaque concentrées aqueuses, on voit d'abord les concrétions intravacuolaires augmenter de volume, atteignant jusqu'à deux fois leur diamètre primitif. Ainsi dans les « stérinoplastes » de MIRANDE, l'hydratation se produisant à partir de la périphérie, le manteau se gonfle plus rapidement que le noyau dont il se sépare, puis successivement se décolle une série de couches concentriques, les plus extérieures correspondant à un maximum d'imbibition. En renouvelant la solution alcaline concentrée on atteindrait ainsi rapidement une dissolution complète. Au contraire, en laissant le même réactif non renouvelé sous la lamelle lutée à la paraffine, au bout d'un jour environ, les concrétions apparaissent entourées de petits cristaux aciculaires entrecroisés, donnant ainsi des figures classiques de saponification [75, p. 120]. En montant entre lame et lamelle une très petite quantité de lécithine dans la solution alcaline concentrée nous avons d'autre part obtenu, également au bout de 24 heures, les mêmes cristaux formant des figures identiques.

Quand on expose un lambeau d'épiderme aux vapeurs d'acide chlorhydrique concentré, les corps lipidiques intravacuolaires sont instantanément dissous, mais, en utilisant de l'acide assez étendu, on peut voir les concrétions se dissoudre, en même temps que diffuse rapidement, dans toute la préparation, une coloration jaune d'or. L'acide chlorhydrique liquide, les acides azotique et sulfurique concentrés dissolvent également les concrétions lipidiques intravacuolaires. En même temps nous obtenons une coloration générale du tissu, jaune d'abord, qui vire ensuite au rouge vif. En faisant agir l'acide sulfurique concentré sur la solution alcoolique des concrétions que nous avons préparée précédemment, nous obtenons encore une colo-

ration jaune orangé qui vire au rouge. De plus, nous pouvons mettre en évidence la formation de cristaux aciculaires qui se montrent groupés en aigrettes sous le microscope, après évaporation à sec de la liqueur rouge obtenue. Les mêmes cristaux se forment d'ailleurs en petite quantité sous lamelle par action de l'acide sulfurique concentré sur les concrétions intravacuolaires dans le tissu épidermique; ils paraissent correspondre à des acides gras qui seraient libérés dans ces conditions. Nous retrouverons des cristaux identiques mis en liberté par hydrolyse des concrétions lipidiques intravacuolaires sous l'effet d'un séjour dans l'étuve (Fig. IV).

Retenons que l'action de l'acide sulfurique concentré produit la dissolution des lipides concrétionnés dans les vacuoles en même temps qu'une coloration rouge générale du tissu épidermique, coloration rouge intense qui, d'après MIRANDE, caractériserait la présence de phytostérides (réaction de Heintz). On sait que cette coloration rouge n'est pas caractéristique et, qu'en présence de stérides, l'acide sulfurique concentré additionné d'anhydride acétique, doit donner une teinte verte (réaction de Liebermann). Or, en effectuant cette dernière réaction sur l'épiderme des écailles bulbaires de Lis blanc, MIRANDE n'obtient qu'une coloration rouge carmin; il observe la même teinte rouge en utilisant le chloroforme et l'acide sulfurique concentré (réaction de Hesse : le chloroforme doit être rouge sang, l'acide verdâtre fluorescent). En répétant de nombreuses fois ces réactions sur l'épiderme du Lis blanc nous avons simplement observé nous aussi une coloration rouge, mais sans obtenir le virage au vert qui devrait se produire nettement si les concrétions intravacuolaires (stérinoplastes) étaient essentiellement constituées par des stérides. Ainsi, après action de l'acide sulfurique concentré en présence de chloroforme, par addition d'acide acétique, on devrait observer une coloration rose avec fluorescence verte (Salkowski); nous obtenons simplement une teinte rouge. Également le réactif de Hirschsohn, mélange d'acides trichloracétique et chlorhydrique, dissout les concrétions lipidiques intravacuolaires et forme, en certains points de la préparation, des gouttelettes rouges.

Contrairement à ce que pensait MIRANDE, toutes ces réactions ne permettent donc pas de déceler de façon certaine la présence de phytostérides concrétionnés dans les vacuoles des cellules épidermiques. Les concrétions intravacuolaires se dissolvent sans se colorer dans les acides forts qui prennent, de ce fait, une teinte rouge : nous allons voir que ce résultat s'accorde avec l'idée, déjà envisagée, que les concrétions seraient constituées par des phospholipides. En effet, l'action *in vitro* de l'acide sulfurique concentré sur de la lécithine (pure, du commerce) produit une coloration rouge qui diffuse en traînées rouge brun dans l'acide. C'est très exactement une action comparable que produisent sous lamelle les réactifs à base d'acide sulfurique concentré

sur des lambeaux de tissu épidermique : sous le microscope on voit des trainées myéliniformes, fortement colorées en rouge, s'étendre sur toute la préparation pour lui donner finalement une teinte générale. Par action *in vitro* de l'acide sulfurique concentré sur de la lécithine, on obtient une liqueur rouge. En évaporant à sec ou en neutralisant cette liqueur ou bien encore en l'additionnant simplement d'une quantité suffisante d'eau (refroidir en même temps), on isole la lécithine et les produits de son hydrolyse sous forme de résidu ou de précipité très solubles dans l'alcool.

Si l'action de l'acide sulfurique concentré sur de la lécithine se réduit ainsi à une simple dissolution des produits résultant de son hydrolyse, par contre, l'action du même acide sur du cholestérol apparaît d'emblée plus complexe. Les cristaux en tablettes de cholestérol se teignent intensément en rouge et la couleur diffuse très peu dans l'acide, à peine jaunissant. Le cholestérol forme finalement une masse pâteuse constituée par un mélange d'hydrocarbures [109]. Cette masse pâteuse rouge brun blanchit par ébullition dans l'alcool qui ne la dissout pas; elle blanchit également par lavage dans une assez grande quantité d'eau. On peut alors obtenir de nouveau une coloration rouge de cette substance par action de l'acide sulfurique concentré. En définitive, cette réaction chimique réalisée *in vitro* sur du cholestérol n'est en rien comparable à ce que nous avons observé sous le microscope : les concrétions lipidiques intravacuolaires se dissolvent sans se colorer dans l'acide sulfurique concentré, celui-ci prenant une teinte rouge qui s'étend progressivement sur toute la préparation.

Les réactifs constitués par des acides concentrés ne permettent donc pas de déceler la présence de phytostérides dans les concrétions lipidiques intravacuolaires. Rappelons d'autre part que nous n'avons pu réussir, en faisant dissoudre de la cholestérine dans le Soudan III, à colorer ces lipides concrétionnés dans les vacuoles des cellules épidermiques. Nous allons constater, enfin, que la présence de phytostérol n'est pas davantage mise en évidence par la digitonine, dans les conditions où l'on effectue d'habitude cette réaction. Les lambeaux d'épiderme étant placés pendant une semaine dans une solution de digitonine à 1 p. 100 dans l'alcool à 40 degrés, nous n'avons jamais observé la formation des cristaux du complexe digitonine-stérol. Nous aboutissons au même résultat négatif en opérant sur les écailles bulbaires des coupes avec le microtome à congélation. Cependant, nous allons voir que l'on peut mettre en évidence la présence de phytostérol dans les concrétions lipidiques intravacuolaires en portant préalablement le tissu épidermique à une température élevée pendant un certain temps dans l'étuve. Dans ces conditions, les concrétions lipidiques étant hydrolysées, le stérol mis en liberté réagit sur la digitonine pour former un complexe cristallisé dans les cellules.

Notre méthode, comportant une hydrolyse préalable des lipides, permet de déceler avec la digitonine la présence de stérol combiné. Nous plaçons des lambeaux d'épiderme entre lame et lamelle dans une boîte de Pétri qui contient également un godet à demi plein d'eau. La boîte de Pétri étant ainsi portée dans l'étuve, nous constatons, au bout d'un temps déterminé pour la température correspondante, que les concrétions lipidiques se sont désagrégées dans les cellules épidermiques. Nous voyons d'abord, par exemple à 55 degrés au bout d'une demi-heure, que les concrétions deviennent moins visibles à l'intérieur de la pellicule protéique qui se trouve ainsi parfois

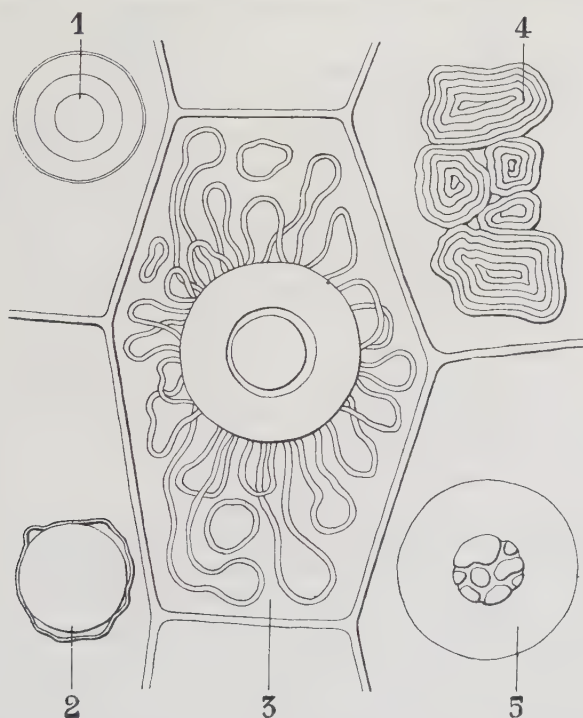


FIG. III. — Désagrégation des concrétions lipidiques intravacuolaires dans l'épiderme des écailles du bulbe de *Lilium candidum* au début du séjour dans l'étuve.

détachée de la surface des concrétions (Fig. III, 1 et 2). Celles-ci se gonflent généralement par suite de l'hydratation qui, plus intense à la périphérie, dissocie les concrétions de la forme « stérinoplaste » en séparant le manteau du noyau (Fig. III, 3). Nous observons de la sorte des figures analogues à celles que nous avons déjà obtenues par action de la potasse sur ces mêmes concrétions lipidiques intravacuolaires. La désagrégation peut aussi faire disparaître à peu près complètement le manteau et l'on observe alors souvent que le noyau

porte des traces de corrosion sous forme de sillons qui s'entrecroisent à sa surface (Fig. III, 5). En même temps que les concrétions se dissolvent ainsi on voit rayonner autour d'elles des cordons emmêlés tandis que la plus grande partie de la vacuole se remplit de figures myéliniques (Fig. III, 3) ou de cordons pelotonnés (Fig. III, 4) absolument identiques à ceux qui remplissent les cellules épidermiques des écailles sèches (Fig. I et II). En prolongeant le séjour dans l'étuve à la même température ou en opérant pendant le même temps à une

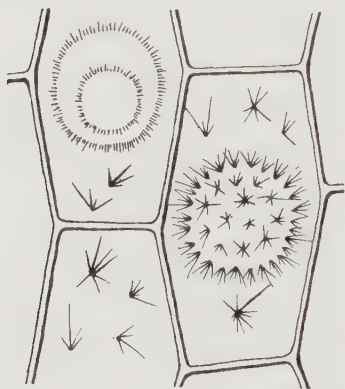


FIG. IV. — Désagrégation complète des concrétions lipidiques intravacuolaires dans l'épiderme après un séjour prolongé dans l'étuve.

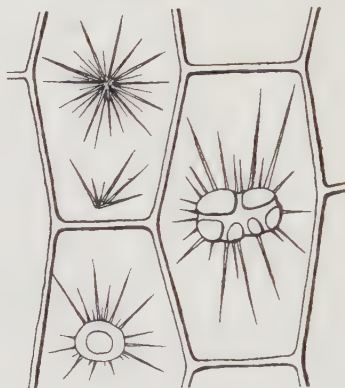


FIG. V. — Cristaux du complexe stérol-digitonine obtenus dans l'épiderme précédent.

température plus élevée, soit par exemple une demi-heure à 61 degrés, 4 h. 30 à 57 degrés, on obtient une désorganisation complète des concrétions et des cordons pelotonnés ou figures myéliniques : il n'en reste plus que de petits cristaux aciculaires groupés en aigrettes, solubles dans l'alcool (Fig. IV). Ces cristaux sont solubles dans les alcalis et saponifiables : ils nous paraissent correspondre à des acides gras qui seraient libérés par l'hydrolyse, d'autant plus que nous les avons vus se former également par action de l'acide sulfurique concentré.

Ayant ainsi obtenu la désagrégation complète des concrétions lipidiques intravacuolaires (Fig. IV) nous plaçons les lambeaux d'épiderme provenant de l'étuve dans une solution de digitonine à 1 p. 100 dans l'alcool à 40 degrés. Au bout de trois ou quatre jours nous pouvons constater la présence, dans les cellules épidermiques, de grands cristaux aciculaires insolubles dans l'alcool à 70 degrés, dans l'acétone et dans l'éther, solubles dans la pyridine. Comme ils sont de plus biréfringents, ces cristaux, groupés en amas rayonnants dans les cellules épidermiques, présentent tous les caractères du complexe stérol-digitonine (Fig. V).

Ce résultat montre que les concrétions intravacuolaires renferment des stérides combinés avec d'autres lipides. Parmi ceux-ci les phospholipides sont particulièrement importants : nous avons vu qu'ils déterminent les caractères morphologiques et microchimiques principaux des concrétions. Nous comprenons maintenant la solubilité des concrétions dans l'acétone puisque la lécithine, insoluble à l'état pur, se trouve ici mélangée à des phytostérides.

Cependant les concrétions d'aspect sphéro-cristallin ne renferment pas de phospholipides et correspondent bien, comme nous allons le voir, à des « calculs » de phytostérol. Quand on traite par la digitonine des lambeaux d'épiderme contenant non seulement des concrétions d'aspect amorphe, mais aussi ces concrétions sphéro-cristallines ou « calculs », on obtient directement des cristaux du complexe digitonine-stérol. Les cristaux de ce complexe sont d'autant plus abondants que l'épiderme traité contenait davantage de « calculs » de phytostérol. Comme nous allons le voir plus loin nous avons, d'autre part, été amené à étudier des bulbes de *Lilium candidum* provenant du Maroc. Or, à la différence de ceux de notre pays, ces bulbes de *L. candidum* ne possèdent aucun corps concrétionné dans les vacuoles des cellules épidermiques de leurs écailles normales (non desséchées); on retrouve seulement, dans les écailles en voie de dessiccation, les « calculs » de phytostérol. Comme ces concrétions sphéro-cristallines apparaissent ainsi seules et en grande abondance, nous avons pu facilement les étudier dans les cellules épidermiques des écailles extérieures de ces bulbes du Maroc.

Les « calculs », très souvent colorés en jaune d'or, se dissolvent complètement dans un lambeau d'épiderme placé pendant quelques minutes dans l'éther. Au contraire, nous avons vu que les « stérinoplastes » apparaissent sans coloration, simplement par différence de réfringence et qu'ils sont extrêmement peu solubles dans l'éther. Par contre, ces calculs se dissolvent plus lentement que les autres concrétions intravacuolaires dans l'acide acétique (1) et dans l'alcool; cependant on ne peut directement les colorer par le Soudan III dissous dans l'alcool. Nous avons cependant obtenu la coloration de ces corps en utilisant le Soudan III dissous dans la diacétine : ainsi les calculs ne sont plus dissous, mais ils se colorent seulement au bout de plusieurs heures. On obtient beaucoup plus rapidement leur coloration par le bleu d'indophénol naissant.

(1) D'après ROQUES, on obtient une coloration bleue des mucilages quand on les traite par une solution acétique d'acétate de benzidine puis, après avoir lavé soigneusement, par un mélange de formol à 30 p. 100 et de perchlorure de fer [91]. Dans l'épiderme des écailles du bulbe de *L. candidum*, les concrétions d'aspect sphéro-cristallin ne se dissolvent pas trop rapidement dans la solution acétique d'acétate de benzidine, de sorte que l'on obtient alors, par le mélange formol-perchlorure de fer, une coloration bleue-verte de ces corps. En même temps, dans toute l'étendue des vacuoles, précipitent en grand nombre de petits corps globuleux colorés également en bleu.

D'autre part, nous avons vu que les réactifs constitués par des acides concentrés ne permettaient pas de déceler la présence de stérol dans les concrétions lipidiques intravacuolaires non cristallisées. Au contraire, nous obtenons par la réaction de Liebermann un résultat positif sur les « calculs » de phytostérol. Ces concrétions sphéro-cristallines se dissolvent en effet rapidement dans l'acide sulfurique concentré additionné d'anhydride acétique et l'épiderme prend encore une teinte rouge générale, mais, fait caractéristique, cette teinte rouge sang du tissu épidermique vire au vert au bout de quelques heures. La digitonine nous permet aussi de caractériser le phytostérol qui constitue ces « calculs ». Si l'on opère cette réaction sur les écailles normales du bulbe de *L. candidum*, originaire du Maroc, l'épiderme ne contenant aucun corps concrétionné dans les vacuoles, on n'obtient pas de cristaux dans les cellules. Au contraire, en opérant sur les cellules épidermiques des écailles les plus extérieures qui présentent des « calculs » de phytostérol, on obtient la formation du complexe cristallisé : digitonine-stérol.

Nous pouvons donc dans les cellules épidermiques des écailles du bulbe de *Lilium candidum* mettre en évidence par la digitonine : directement le phytostérol libre formant les « calculs » et, après hydrolyse des autres concrétions intravacuolaires dans l'étuve, le phytostérol qui se trouvait associé à des phospholipides. Si l'on se trouve en présence de stérol libre, comme dans le cas des « calculs » que nous venons d'étudier, on n'a donc pas besoin de soumettre au préalable le tissu épidermique à l'action de la chaleur pour obtenir un résultat positif avec la digitonine.

D'ailleurs, dans des lambeaux d'épiderme placés entre lame et lamelle dans une boîte de Pétri portée dans l'étuve, les « calculs » ne se désagrègent pas aussi facilement que les autres concrétions intravacuolaires. C'est ainsi que, par exemple, ils sont conservés après un séjour de six heures dans l'étuve à 56 degrés. Dans l'eau portée à l'ébullition sous lamelle ces « calculs » de phytostérol ne sont pas immédiatement désagregés. Nous n'avons obtenu cette désagregation qu'en prolongeant l'action de la chaleur jusqu'à évaporation complète de l'eau contenue sous la lamelle et chauffage ainsi à sec. Au contraire, par ébullition sous lamelle dans le tissu épidermique les concrétions lipidiques intravacuolaires non cristallisées se désagrègent rapidement, comme l'a signalé Marcel MIRANDE.

Après un séjour prolongé dans l'étuve nous réalisons, par conséquent, dans les vacuoles des cellules épidermiques, l'hydrolyse des stérides, mais l'action modérée de la chaleur produit d'abord, comme nous l'avons constaté, l'apparition de figures myéliniques (Fig. III). C'est que les stérides avant d'être hydrolysés sont probablement détachés des phospholipides auxquels ils se trouvaient associés. Les figures myéliniques seraient formées, dans ces conditions, par les phospho-

lipides libérés. Mais nous devons alors étudier l'épiderme des écailles desséchées pour voir ce que deviennent les stérides quand, sous l'effet de la dessiccation, le vacuome apparaît entièrement concrétionné en présentant des formes myéliniques (Fig. I et II). Les lambeaux d'épiderme, prélevés sur ces écailles desséchées, étant placés dans la digitonine, nous avons pu constater l'absence complète de stérol, même après un séjour prolongé du tissu épidermique dans l'étuve. Au cours de la dessiccation le phytostérol disparaîtrait, par conséquent, dans le vacuome des cellules épidermiques et il s'établirait ainsi une relation entre la teneur des vacuoles en phytostérol et leur état plus ou moins avancé de deshydratation.

Vérifications « in vitro ».

Nous allons pouvoir vérifier, maintenant, les résultats d'ordre histo-chimique, précédemment exposés, en opérant *in vitro* sur l'extrait alcoolique des écailles sèches. Sous l'effet de la dessiccation, nous avons, en effet, constaté que les cellules épidermiques se remplissaient progressivement de masses concrétionnées résultant de la précipitation du suc vacuolaire (Fig. I). Ces corps représentant ainsi finalement en volume la presque totalité du tissu épidermique et les écailles bulbaires se réduisant à leur épiderme ridé, l'alcool étendu n'entraînera pas en dissolution une quantité considérable des autres constituants cellulaires. Les résultats obtenus *in vitro* correspondront bien à la composition des corps étudiés dans le tissu.

Il ne peut être question d'utiliser ici l'éther de pétrole ou l'éther éthylique, étant donné que nous retrouvons, sous le microscope, les masses concrétionnées dans les cellules des lambeaux épidermiques immergés pendant plusieurs jours dans ces solvants. C'est avec de l'alcool à 70 degrés, étendu de son volume d'eau, que nous épuisons méthodiquement les écailles en voie de dessiccation prélevées à la périphérie des bulbes et soigneusement broyées. Nous opérons dans trois tubes de Borrel maintenus fermés au moyen de leurs couvercles dans l'intervalle des opérations; nous déplaçons en sens inverse la matière à épuiser et le solvant alcoolique.

L'extrait alcoolique, filtré, présente une coloration jaune brun et ne s'éclaircit pas à l'ébullition. En l'évaporant dans l'étuve à 50 degrés nous obtenons un résidu également coloré en jaune brun, très soluble dans la potasse à 10 p. 100, insoluble dans l'éther. Ce résidu, traité à l'ébullition par de l'alcool à 70 degrés étendu de son volume d'eau, donne une liqueur jaune clair. Cette coloration peut être due à la présence de composés oxyflavoniques. Pour le savoir, nous prenons une assez grande quantité de l'extrait alcoolique jaune brun et nous concentrons fortement par évaporation. Nous ramenons ensuite

au même volume avec de l'eau distillée qui détermine la formation d'un louche; après filtration, étudions la liqueur jaune obtenue. L'addition de perchlorure de fer en solution aqueuse fait apparaître un brunissement verdâtre sans précipitation. Le réactif de Courtonne (acétate de plomb) détermine la formation d'un précipité jaune en flocons tombant lentement au fond du tube à essai, caractérisant ainsi la présence des composés oxyflavoniques. Nous étudierons dans la dernière partie de ce travail les pigments anthocyaniques et les composés oxyflavoniques associés aux lipides intravacuolaires et notamment la présence de ces composés dans le vacuome des cellules épidermiques d'écailles en voie de dessiccation.

L'extract alcoolique jaune brun restant, étant d'abord fortement concentré par évaporation, nous l'additionnons ensuite d'une assez grande quantité d'alcool absolu et nous refiltrons (il faut s'assurer que la liqueur obtenue ne précipite plus par addition d'alcool absolu). En ajoutant alors de l'acétone nous obtenons un précipité blanc en flocons qui se montre soluble dans l'alcool et dans la potasse. Ce même précipité étant calciné avec de la potasse et du nitrate de potassium, nous reprenons par quelques centimètres cubes d'eau distillée et une goutte d'acide azotique. Après filtration, la liqueur ainsi obtenue, additionnée de son volume d'acide azotique, donne avec le réactif molybdique un précipité jaune (phosphomolybdate d'ammonium) soluble dans l'ammoniaque. Nous vérifions ainsi la présence du phosphore entrant dans la constitution de la « lécithine » que l'acétone avait précipitée. Nous pouvons également précipiter cette « lécithine » dans la liqueur alcoolique primitive sous l'action du chlorure de cadmium dissous dans de l'alcool méthylique. Avec l'acétone même nous pouvons réaliser des précipitations successives : le précipité resté sur filtre mouillé étant redissous dans l'alcool absolu, l'addition d'acétone (ou mieux d'acétone contenant en dissolution du chlorure de magnésium) nous redonne un précipité floconneux blanc.

Ces résultats montrent que l'extract obtenu, avec de l'alcool à 70 degrés étendu de son volume d'eau, sur les écailles en voie de dessiccation, contient un corps phospholipidique voisin de la lécithine. Par contre, il nous a été impossible de mettre en évidence, par la réaction de Liebermann, la présence de stérines dans le résidu de l'évaporation de cet extract.

Aussi, pour compléter ces recherches, avons-nous effectué, sur une nouvelle série d'écailles desséchées, une extraction en employant directement de l'alcool à 95 degrés. Nous obtenons, après filtration, une liqueur colorée en jauné d'or qui donne, par évaporation, un résidu d'aspect amorphe, coloré en jaune très clair. Même en quantité assez peu considérable (0,1 g.) ce résidu additionné de 3 cc. de chloroforme ne se dissout pas entièrement. Nous ajoutons de plus 1 cc. d'anhydride acétique et de l'acide sulfurique concentré goutte à goutte en évitant

soigneusement d'agiter. Nous voyons dans ces conditions apparaître une coloration verte très claire. Les stérides n'existent donc qu'en faible quantité dans les écailles bulbaires en voie de dessiccation.

FLEURS DE LIS

Comme l'a montré Marcel MIRANDE, on trouve ces lipides dans les cellules épidermiques des écailles bulbaires de toutes les espèces du genre *Lilium* : il suffit que les écailles se dessèchent pour que l'on observe la formation de concrétions lipidiques. Mais, seule, l'espèce *L. candidum* présente une richesse de son suc vacuolaire en lipides assez grande pour qu'il existe, normalement, des corps lipidiques (correspondant aux « stérinoplastes » de MIRANDE) déjà concrétionnés dans les vacuoles des cellules épidermiques, avant toute dessiccation des écailles bulbaires.

Dans les fleurs de diverses espèces du genre *Lilium* nous retrouvons des concrétions lipidiques intravacuolaires, mais leur présence dans les diverses espèces examinées se montre régulière et indépendante de toute dessiccation. Ces concrétions lipidiques existent dans les cellules épidermiques du gynécée et de l'androcée, parfois aussi du périanthe (1)

Fleurs de *Lilium candidum*.

Dans les fleurs de *L. candidum*, vendues chez les fleuristes tout à fait au début de la saison, nous trouvons des concrétions lipidiques intravacuolaires. Les coupes de l'ovaire jeune, traitées par la méthode de Regaud, permettent en effet de constater la présence, dans chacune des cellules épidermiques, de corps vésiculeux ou spongieux, fortement colorés en noir (Fig. VI, III et IV). En prélevant avec une aiguille lancéolée des lambeaux d'épiderme sur l'ovaire, le style ou le stigmate, nous pouvons vérifier, par coloration vitale avec le bleu brillant de crésyl ou le rouge neutre, que ces corps globuleux correspondent bien à des concrétions intravacuolaires. En étudiant ainsi vitalement le tissu épidermique, nous trouvons, concrétionnés dans les vacuoles, de gros corps globuleux, souvent fusionnés en une masse de forme lobée, ou des amas de petits éléments granuleux (Fig. VI, I). En effectuant, avec le microtome à congélation, des coupes dans l'ovaire

(1) Il importe de préciser que cette étude a été faite avant l'été, sur des fleurs obtenues par culture forcée dans les serres. La suite de notre travail montrera l'importance de cette précision.

Rappelons, d'autre part, que STOKLASA a montré que la lécithine est un produit du fonctionnement des feuilles, au même titre que l'amidon, et qu'elle est transportée des feuilles dans la fleur où elle s'accumule dans la corolle, pour émigrer ensuite dans les étamines et se localiser, enfin, dans le pollen [101].

nous avons pu constater que ces concrétions intravacuolaires sont surtout abondantes dans l'épiderme. L'assise sous-épidermique en renferme également quelques-unes, mais on n'en trouve pas dans le tissu chlorophyllien constituant les autres assises du mésophylle (Fig. VI, *II*). De plus, les mêmes corps se montrent également concrétionnés dans l'épiderme des étamines.

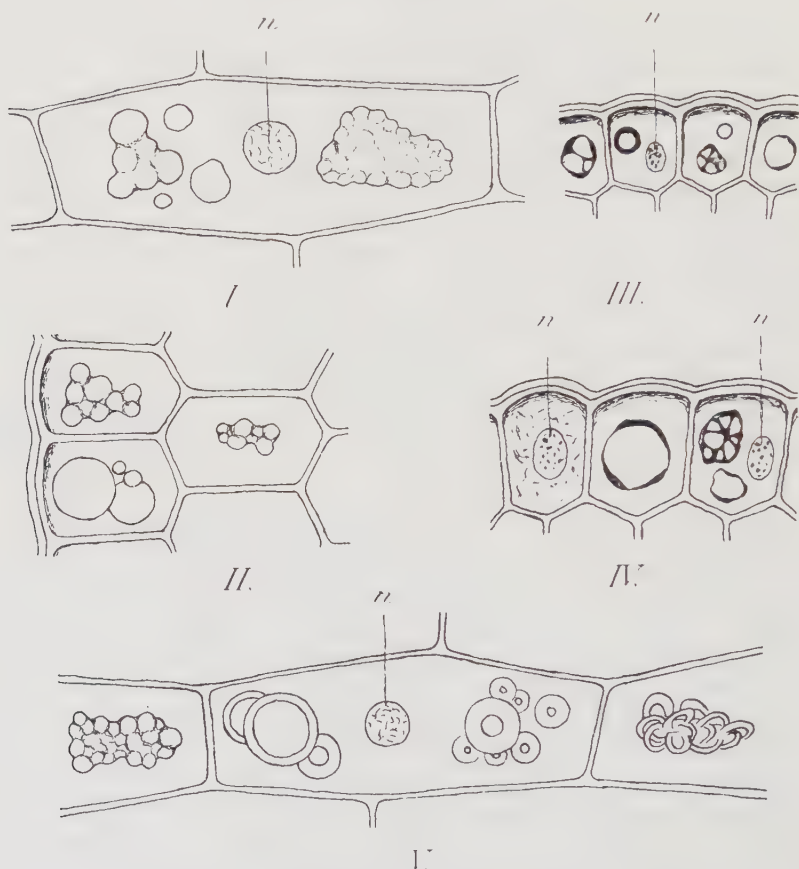


FIG. VI. — Concrétions lipidiques intravacuolaires : *I*, épiderme du style de *Lilium candidum* examiné vitalement; *II*, coupe de l'ovaire de *L. candidum* au microtome à congélation; *III*, coupe de l'ovaire jeune de *L. candidum* (méthode de Regaud); *IV*, coupe de l'ovaire plus développé de *L. candidum* (méthode de Regaud); *V*, épiderme du style de *L. Harrisii* examiné vitalement; *n*, noyau.

Ces concrétions intravacuolaires se dissolvent rapidement et sans présenter la moindre coloration dans le Soudan III à l'alcool. Nous sommes cependant arrivé à les colorer en faisant dissoudre préalablement de la lécithine dans la solution alcoolique de Soudan. Mentionnons simplement que l'étude histochimique de ces concrétions, dans

l'épiderme du gynécée et de l'androcée, nous a permis de vérifier les principaux résultats obtenus précédemment sur l'épiderme des écailles bulbaires.

Fleurs de *Lilium longiflorum* Harrisii.

Pendant tout l'hiver, on trouve chez les fleuristes les grandes fleurs d'un blanc pur, isolées ou par groupe de deux, longues de 15 à 20 centimètres, en forme de long entonnoir, du *L. longiflorum* Harrisii, Lis des Bermudes ou de Pâques. L'épiderme du périanthe, dans ces fleurs comme dans celles de *L. candidum*, ne présente pas de caractère cytologique particulier, mais les concrétions lipidiques intravacuolaires existent encore dans les cellules épidermiques de l'ovaire, du style, du stigmate et du filet des étamines.

En plaçant un lambeau de tissu épidermique dans un colorant vital (rouge neutre, bleu brillant de crésyl), on voit les concrétions se colorer plus intensément que le suc vacuolaire dans lequel elles baignent. On distingue ainsi, dans les vacuoles, un nombre parfois considérable de corps globuleux qui se localisent le plus souvent aux deux extrémités de chaque cellule épidermique. Ces corps globuleux sont presque toujours constitués par un noyau qu'entoure une couche périphérique d'épaisseur variable; cependant on n'observe aucune différence de réfringence entre ces deux parties. C'est très exactement l'aspect que prennent les concrétions lipidiques intravacuolaires du bulbe de *L. candidum* dans les écailles en voie de dessiccation (Pl. I, 5, C₁) et la ressemblance s'accroît encore du fait que ces concrétions dans le *L. Harrisii* présentent également une croix noire en lumière polarisée. Parfois, les petits éléments granuleux se trouvent étroitement soudés pour constituer de volumineuses concrétions compactes. Enfin, il n'est pas rare de trouver ces amas concrétionnés sous forme de cordons emmêlés rappelant plus ou moins des figures myéliniques (Fig. VI, V).

Toutes ces concrétions sont rapidement dissoutes par l'alcool que l'on ajoute sous lamelle; au cours de cette dissolution les corps globuleux les plus volumineux se dissocient nettement en cordons pelotonnés, ces pelotons se réduisant ensuite à une série d'enveloppes concentriques chiffonnées. Ces ressemblances d'ordre morphologique avec les corps concrétionnés dans les vacuoles des cellules épidermiques dans les écailles du bulbe de *L. candidum* se poursuivent sur le plan histochimique. Nous constatons la même réduction lente de l'acide osmique, accompagnée d'ailleurs également d'une dissolution qui devient complète seulement au delà de 24 heures, ainsi que la coloration par le bleu d'indophénol naissant. Pour réussir à colorer ces corps avec le Soudan III il est nécessaire de saturer la solution alcoolique du colorant avec de la lécithine. Dans ces conditions, les

concrétions lipidiques intravacuolaires ne sont plus rapidement dissoutes sous lamelle et se teignent en jaune orangé. On obtient enfin une coloration jaune brun avec l'iodo-iodure de potassium.

Cependant les concrétions intravacuolaires des fleurs de *L. Harrisii* présentent d'autres réactions que celles des phospholipides : elles offrent les caractères microchimiques des corps protéiques. C'est ainsi que l'acide azotique concentré les colore en jaune clair, le réactif de Millon en rouge brique et que le biuret leur donne une coloration violette. Ces concrétions intravacuolaires sont donc constituées par un complexe lipo-protéique.

Quand la fleur de *L. Harrisii* commence à se faner on ne retrouve plus dans les vacuoles des cellules épidermiques du gynécée et de l'androcée que de petits amas le plus souvent d'aspect cristallin.

Fleurs de *Lilium speciosum*.

GUILLIERMOND a découvert, dans le périanthe de cette fleur, des corps analogues à ceux qu'il a étudiés dans les feuilles et les fleurs des *Iris* [33]. Chaque cellule de l'épiderme renferme un, parfois plusieurs corps sphériques très réfringents, d'aspect oléagineux. L'acide osmique noircit ces globules en les dissolvant peu à peu, le bichromate de potassium les colore en jaune. La dissolution est immédiate dans les alcalis même très dilués et rapide dans l'alcool et le formol. Ces corps présentent une forte électivité pour les colorants vitaux et se colorent post-vitalement d'une manière élective par le bleu Coton, le rouge neutre en solution alcoolique et l'hématoxyline de Delafield.

Nous avons tout d'abord constaté la présence des mêmes corps dans l'épiderme des étamines, de l'ovaire, du style et du stigmate. Quand la fleur se fane les pièces florales commençant à se dessécher, on observe que les corps globuleux des cellules épidermiques présentent une structure granuleuse en subissant un gonflement. Nous avons de plus remarqué la formation de figures myéliniques quand, sous l'effet de la dessiccation, toute la cavité cellulaire finit par être à peu près complètement remplie par une masse concrétionnée.

Nous ne pouvons pas colorer directement ces corps avec le Soudan III à l'alcool qui les dissout instantanément. Par contre, après fixation dans le bichromate de potassium à 3 p. 100 pendant deux jours cette dissolution ne se produit plus. Mais les corps globuleux présentent alors une coloration jaune très accentuée : on ne peut donc songer à obtenir ainsi une coloration spécifique des lipides avec le Soudan III. Aussi avons-nous utilisé le noir Soudan B; dans ce colorant les corps, déjà colorés en jaune par la fixation dans le bichromate, prennent la teinte noire spécifique des lipides.

Avec le réactif iodo-ioduré très concentré, nous obtenons une coloration rouge intense de ces corps, en même temps que précipitent, dans les vacuoles, de nombreux petits granules agités de mouvements

browniens. Le corps préexistant se vésiculise tandis que les grains du précipité, également teints en rouge, augmentent progressivement de volume en se fusionnant. Nous observons ainsi dans chaque cellule la formation d'une masse concrétionnée présentant des prolongements myéliniformes. Les concrétions lipidiques intravacuolaires paraissent donc ici renfermer également des phospholipides. Cette conclusion se trouve confirmée par la réaction suivante : ayant fait macérer dans l'alcool absolu des pièces florales nous avons évaporé la solution alcoolique puis dissous le résidu dans l'acide sulfurique concentré, la liqueur rouge obtenue nous donne alors par addition d'eau un précipité rouge foncé comme ferait une solution sulfurique de lécithine.

Publication posthume du travail de Mirande.

Les résultats que nous venons d'exposer ont fait l'objet d'une note parue dans les Comptes rendus de la Société de Biologie en 1933 [83]. Mais voici qu'en 1936 la dernière partie, encore inédite, de l'œuvre de MIRANDE vient d'être confiée à M. GUILLIERMOND qui la publie aussitôt [71]. Nous y trouvons l'étude cytochimique des fleurs de *Lis* dans lesquelles MIRANDE cherche à retrouver des corps stériques analogues à ceux qu'il a découverts et étudiés dans les bulbes. On va voir que cette publication confirme en les élargissant les résultats de nos propres recherches.

MIRANDE a pu déceler, en effet, la présence de blocs concrétionnés de stérine dans les feuilles, les préfeuilles, les bractées florales et dans le périanthe de *L. candidum*. Les bractées florales et les préfeuilles sont parfois presque blanches dans des inflorescences chétives ou vieillissantes et la stérine, particulièrement abondante, constitue alors des amas concrétionnés, mamelonnés, ressemblant à des grappes de raisin. Les mêmes corps existent en moins grande abondance dans les feuilles vertes. « Dans ces feuilles diverses (bractées, préfeuilles, feuilles) ce n'est pas dans toutes les cellules sans exception qu'il y a des blocs, dans beaucoup, mais c'est loin d'être général ». Dans la fleur en bouton les sépales et les pétales présentent, tout à fait au sommet, dans l'épiderme de leur face inférieure des blocs d'aspect spongieux constitués par des amas de granulations qui, dans certains cas, paraissent nettement remplir de « vraies vacuoles, non douteuses, de toutes tailles, rondes ou ovoïdes ». Ces masses spongieuses, parfois en partie cristallisées, tiennent une très grande place au centre des cellules : elles semblent être un acheminement vers la forme concrétionnée. Avec le bleu d'indophénol naissant MIRANDE obtient une coloration violette de ces amas granuleux. En traitant par la glycérine à l'ébullition il constate la disparition de ces corps. L'eau bouillante ne change guère, par contre, l'aspect de ces masses concrétionnées.

Avec l'alcool on observe une rapide dissolution « laissant en place le squelette plasmique de l'amas stérinique, squelette fragmenté si les corps globuleux n'étaient pas étroitement soudés ou bien unique dans le cas contraire ». Dans ce dernier cas il reste un sac contourné, lobé, d'aspect cérébroïde, qui se colore par les réactifs iodés. La réaction d'Axenfeld donne une coloration rouge de ce manteau, attestant sa nature protéique. Avec les solutions iodées (Lugol) les enclaves stériniques prennent une teinte jaune assez foncée. La présence de ces amas granuleux concrétionnés n'est pas constante : dans d'autres fleurs de *Lis blanc*, en effet, MIRANDE ne les retrouve plus.

Dans les étamines MIRANDE constate la présence de petits corps sphéro-cristallins donnant généralement une croix noire en lumière polarisée. Ces sphéro-cristaux présentent parfois très nettement des stries radiales ; ils sont très solubles dans l'alcool. Sous l'action ménagée de l'acide sulfurique, en présence d'anhydride acétique, ces corps de nature stérinique jaunissent d'abord, puis se résolvent en un amas de très petits cristaux rouges. D'autre part, sous l'effet de la dessiccation, les cellules apparaissent remplies de petites boules biréfringentes disposées en traînées, prenant parfois l'aspect de corps annelés. Dans l'épiderme de ces étamines desséchées l'action de l'alcool produit la dissolution rapide des cristaux et dissout moins rapidement les petits corps globuleux.

Dans la fleur de *L. tigrinum* MIRANDE a retrouvé des concrétions stériniques bien plus abondantes. Ces enclaves sont réparties dans toute l'étendue des sépales et non plus seulement vers l'extrémité papilleuse comme dans le *Lis blanc*. On les trouve non seulement dans les étamines, mais aussi et surtout dans le style, particulièrement sous le stigmate. Sous la simple influence de l'eau les enclaves stériniques prennent peu à peu la structure fibrillaire, observée déjà par MIRANDE dans les écailles du bulbe de *L. Martagon*. Dans ces écailles bulbaires cependant les blocs concrétionnés présentaient la structure fibrillaire, sous l'action de la chaleur tandis que dans les fleurs du *Lis tigré* l'élévation de température produit, bien au contraire, la disparition de cette structure. Avec les réactifs iodés les enclaves se colorent en brun rouge.

Dans les fleurs d'autres espèces, MIRANDE signale également la présence de blocs concrétionnés, plus rares et plus petits. Les fleurs de *L. excelsum (testaceum isabellinum)* en renferment dans l'épiderme de la face dorsale des sépales vers la région papilleuse et « des formations fugaces de petites boules biréfringentes se forment çà et là au sein de vastes vacuoles ». Les étamines de *L. croceum umbellatum* présentent des amas de stérine très petits, agités de mouvements browniens. Enfin d'autres espèces (*L. superbum*, *L. Thunbergianum biligulatum* et *L. Thunbergianum alutaceum*) ne présentent plus aucune enclave caractéristique dans l'épiderme de leurs pièces florales.

FEUILLES ET FLEURS D'IRISHistorique.

Au cours de ses recherches cytologiques sur les pigments anthocyaniques et les composés oxyflavoniques, GUILLIERMOND a étudié, dans certaines fleurs, des vacuoles paraissant dépourvues de tanins, mais renfermant des substances colloïdales susceptibles d'adsorber le pigment ou le composé oxyflavonique [33]. Ainsi, dans les cellules épidermiques du stigmate de la fleur d'*Iris germanica*, dès le stade des vacuoles filamenteuses en voie de gonflement, apparaissent de minuscules grains de $1\ \mu$ environ de diamètre, peu nombreux et animés de mouvements browniens. Ces grains se fusionnent au moment de la confluence des vacuoles en un seul corps d'abord incolore et présentant la réfringence d'un globule oléagineux. Quand il se forme de l'anthocyane ces corps peuvent, suivant les cellules dans lesquelles ils se trouvent, se pigmenter en même temps que le suc vacuolaire, avant celui-ci ou rester seuls colorés. Enfin, dans les cellules des veinules brunes de l'onglet, d'autres corps semblables peuvent apparaître directement colorés au cours du développement des vacuoles. Ces corps subsistent jusqu'à l'ouverture de la fleur, puis, après avoir pris une structure granuleuse, se disséminent dans la vacuole en se dissolvant peu à peu.

Ces corps globuleux ne sont pas biréfringents, ils se montrent constitués par une substance visqueuse facile à déformer et susceptible de se gonfler considérablement sous l'action de certains réactifs. Quand ils ne sont pas pigmentés ils apparaissent dans les colorations vitales en rouge cerise par le rouge neutre et en bleu vert par le bleu de crésyl; ces colorants déterminent en même temps la précipitation dans le suc vacuolaire d'autres corps présentant le même aspect. La plasmolyse permet également d'obtenir la précipitation dans la vacuole d'autres corps qui paraissent de même constitution que le corps préexistant avec lequel ils peuvent même se fusionner. Ces faits établis par GUILLIERMOND prouvent que les corps étudiés résultent de la condensation partielle d'une substance se trouvant dans le suc vacuolaire à l'état de solution colloïdale et qui adsorbe le pigment.

On retrouve des corps semblables dans les cellules épidermiques des fleurs d'*Iris pallida*. On les retrouve aussi dans les fleurs de l'*Iris florentina* (1).

(1) Ces corps paraissent analogues à ceux qui ont été signalés pour la première fois par MOLISCH dans les feuilles de Chou rouge et considérés par cet auteur comme des gouttelettes d'anthocyane amorphe [74]. Ils correspondent également aux cyanoplastes décrits par POLITIS dans diverses fleurs, notamment dans l'*Iris*

GUILLIERMOND a montré que les feuilles d'*Iris germanica* présentent à leur base, dans les vacuoles de leurs cellules épidermiques, des corps sphériques, ayant le même aspect et les mêmes caractères microchimiques que les corps décrits dans les cellules épidermiques des pièces florales de la même plante [32]. C'est surtout dans les feuilles des deux variétés *simile* et *speciosa* de l'Iris des jardins que l'étude microchimique de ces corps peut être faite en raison de leur plus grande abondance et de leur volume beaucoup plus considérable. En effet, dans ces deux espèces, les corps de réfringence oléagineuse peuvent occuper une grande partie des cellules épidermiques; lorsque la vacuole en contient plusieurs, en se fusionnant, ils peuvent prendre la forme d'haltères ou présenter plusieurs lobes. Généralement ces corps présentent une structure absolument homogène. Dans certains cas cependant, ils se montrent constitués par un globule central, très réfringent, entouré de plusieurs zones périphériques concentriques, alternativement hyalines et réfringentes. D'autre part, il peut se produire un gonflement considérable de ces corps, surtout dans les feuilles des variétés *simile* et *speciosa*, et l'on voit ainsi la plus grande partie de la vacuole remplie par une masse réfringente égalant deux à cinq fois le volume du noyau, et présentant un contour irrégulier lobé. Cette masse en voie de gonflement se remplit de petites vacuoles qui lui donnent d'abord un aspect spongieux puis la transforment en une sorte de réseau qui peut s'étendre dans toute la vacuole. Ces corps peuvent aussi en se gonflant pousser des prolongements digitiformes; ils semblent donner alors des figures myéliniques.

Dans l'épiderme de ces feuilles, GUILLIERMOND a constaté, par coloration vitale ou plasmolyse, la précipitation, dans chaque vacuole, d'un plus ou moins grand nombre de corpuscules de même forme et de même réfringence que le corps préexistant. Comme dans l'épiderme des pièces florales, ce corps résulte donc de la condensation partielle d'une substance colloïdale se trouvant à l'état de pseudo-solution dans la vacuole. Dans les cellules en voie de différenciation, quand les petites vacuoles filamenteuses se gonflent et se réunissent, on voit apparaître un ou plusieurs minuscules corpuscules de un μ environ de diamètre, fortement réfringents et animés de mouvements browniens. En se fusionnant s'ils sont au nombre de plusieurs ou en s'accroissant simplement dans le cas contraire ces corpuscules finissent par constituer dans la grosse vacuole résultant de la confluence des petites vacuoles un corps plus volumineux qui, en grossissant peu à peu, prend dans les cellules adultes l'aspect d'un gros corps sphérique.

GUILLIERMOND a étudié les caractères microchimiques de ces corps, à la fois sur les fleurs (avant la pigmentation) et les feuilles

fimbriata [79]. Enfin, plus récemment, LIPMAA a signalé des corps semblables dans les fleurs d'*Erythraea* et donné le nom d'anthocyanophores à ces sphères qui seraient de nature mucilagineuse [50].

d'*Iris germanica*, puis contrôlé ces caractères sur les deux variétés *simile* et *speciosa*. L'acide osmique noircit ces corps en les dissolvant plus ou moins vite. Le réactif iodo-ioduré les colore en brun foncé. En quelques minutes l'éther et le chloroforme les dissolvent, tandis que dans l'alcool, l'hydrate de chloral, l'acétone et l'acide picrique la dissolution est instantanée. Ces corps se dissolvent très rapidement aussi dans les alcalis (potasse, soude, ammoniacque) même en solution extrêmement diluée et dans l'eau bouillante. Par contre, ils sont beaucoup plus résistants vis-à-vis des acides : l'acide sulfurique concentré leur donne une teinte jaune pâle et les gonfle en les vacuolisant, mais ne les dissout qu'au bout de cinq à dix minutes. L'acide azotique concentré les gonfle aussi et les jaunit fortement : il les dissout au bout d'un quart d'heure environ. Cependant la dissolution est très rapide dans l'acide acétique. Les corps de l'*Iris* se dissolvent dans tous les fixateurs usités en cytologie, sauf dans le liquide de Regaud. Dans les variétés *simile* et *speciosa*, la fixation par la méthode de Regaud peut faire apparaître, dans la vacuole, un fin coagulum d'une couleur jaune très pâle.

Ayant montré que les corps de l'*Iris* ne sont pas constitués par un tanin ni par un protide et, d'autre part, constatant l'inefficacité des méthodes habituelles de détection histochimique des lipides, GUILLIERMOND envisage l'hypothèse de LIPMAA, d'après laquelle on se trouverait en présence d'un mucilage. Le rouge de ruthénium ne donne aucune coloration, mais, par contre, on obtient une coloration élective extrêmement nette de ces corps avec le bleu coton, le rouge neutre en solution alcoolique et l'hématoxyline de Delafield. Cependant, GUILLIERMOND souligne le manque de spécificité de ces réactions des mucilages et montre, d'autre part, que la constitution des corps de l'*Iris* apparaît très complexe en étudiant les figures qu'ils présentent au moment de leur dissolution. Le corps contenu dans chacune des cellules paraît alors se contracter et prendre une consistance beaucoup moins fluide, de plus, on voit se former, sur sa périphérie, des fentes radiales qui lui donnent un peu l'aspect d'un grain d'amidon en voie de digestion. Souvent aussi, ce corps donne, à ce stade, l'impression d'être entouré par une fine pellicule qui se rompt, tandis que le reste du corps se transforme en petits grains assemblés en une masse muriforme qui, parfois, reste accolée à la pellicule externe plus ou moins froissée. Enfin, dans un dernier stade, le corps muriforme se réduit en une fine poussière de minuscules et nombreux grains réfringents qui restent agglomérés en une masse à contour irrégulier, puis se disséminent ensuite dans la vacuole pour s'y dissoudre.

Résultats de nos recherches

Les corps globuleux des cellules épidermiques d'*Iris* correspondent à des concrétions intravacuolaires, puisqu'ils résultent de la condensation partielle d'une substance se trouvant dans le suc vacuolaire à l'état de solution colloïdale. Comme dans l'épiderme du bulbe de *Lilium candidum*, on voit apparaître, dans les jeunes vacuoles, de petits grains sphériques qui se réunissent ensuite pour constituer des concrétions lobées. Dans certains cas, les corps globuleux de l'épiderme d'*Iris* présentent la dissociation en sphères concentriques, souvent observée dans les concrétions intravacuolaires du bulbe de Lis blanc. Nous retrouvons les mêmes figures de corrosion qui font ressembler ces corps à des grains d'amidon en voie de digestion. Enfin, nous pouvons observer dans l'épiderme des feuilles d'*Iris* la précipitation d'une grande partie du vacuome et l'apparition de figures myéliniformes, comme cela se produit sous l'effet de la dessiccation ou de la chaleur humide dans les écailles bulbaires des diverses espèces du genre *Lilium*.

En inclinant assez rapidement le tube du microscope pour l'amener en position horizontale, la préparation se trouvant ainsi placée dans un plan vertical, nous avons constaté que les corps globuleux sont plus denses que le suc vacuolaire dans lequel on les voit tomber. Comme dans l'épiderme du bulbe de *L. candidum*, en faisant tourner la préparation de 180 degrés les mêmes corps tombent en sens inverse et c'est seulement au bout d'un temps excédant cinq minutes qu'ils se trouvent immobilisés définitivement. La coloration vitale au rouge neutre ne produit pas plus tôt cet arrêt.

Ces concrétions intravacuolaires de l'*Iris* ressemblent à celles du Lis par leur solubilité dans l'alcool, l'hydrate de chloral, le chloroforme, l'acétone, l'acide acétique et les acides forts concentrés, mais s'en distinguent nettement par leur solubilité dans l'éther (1). Nous constatons également une grande différence de solubilité dans les alcalis : dans l'épiderme des écailles du bulbe de *L. candidum* la potasse à 10 p. 100 produit une dissolution complète des concrétions au bout de 16 heures, tandis que les corps globuleux des feuilles d'*Iris* sont dissous en une minute par le même réactif.

L'acide osmique noircit ces concrétions intravacuolaires de l'*Iris* comme celles du Lis, mais il ne dissout les corps du Lis qu'au delà de 24 heures, tandis que dans les feuilles d'*Iris* la dissolution est généralement beaucoup plus rapide. Les corps globuleux de l'*Iris* sont, d'autre part, dissous en moins d'une minute dans le formol, tandis

(1) Dans le bulbe de *L. candidum*, cependant, les concrétions cristallisées (calculs de phytostérol) présentent la même solubilité dans l'éther que ces corps de l'*Iris*.

que les concrétions du bulbe de *L. candidum* ne se dissolvent qu'au bout d'une heure en moyenne. Pourtant, dans l'épiderme des écailles jeunes, cette dissolution est complètement réalisée en dix minutes. Enfin, le mélange fixateur de Regaud conserve aussi bien les corps de l'*Iris* que ceux du Lis.

Un lambeau d'épiderme étant monté sous lamelle dans une goutte de réactif de Schiff incolore, les corps globuleux intravacuolaires prennent en quelques minutes une teinte rouge vif, mais en même temps ils se trouvent lentement dissous. Probablement en rapport avec cette dissolution, la teinte obtenue est moins intense que pour les concrétions du Lis. De plus, dans l'épiderme du bulbe de Lis, la coloration par le réactif de Schiff s'étend rapidement à l'ensemble du vacuome concrétionné, tandis que dans l'épiderme des feuilles d'*Iris* on observe à peine des précipités intravacuolaires finement granuleux colorés en rouge.

Quand on emploie le Soudan III dissous dans l'hydrate de chloral ou dans l'alcool, il se produit une dissolution immédiate des corps de l'*Iris* et, très exactement comme dans le cas du Lis, il est impossible d'obtenir ainsi directement une coloration. Le même résultat négatif est obtenu par emploi du Soudan en solution dans le lacto-phénol d'Amann ou dans la diacétine. Nous avons, de plus, essayé de fixer par le mélange chromo-osmique de Zweibaum pour colorer ensuite avec le Soudan. Mais les corps globuleux étant solubles dans l'acide osmique sont très mal conservés par cette fixation et, de plus, ils se dissolvent encore très rapidement dans la solution alcoolique du colorant.

Le mélange fixateur de Regaud conserve bien mieux les corps globuleux de l'*Iris* et les rend insolubles dans l'alcool. Mais ce fixateur leur donne (en rapport avec la présence de composés oxyflavoniques) une teinte jaune, plus ou moins accentuée, qui diminue considérablement la netteté de la coloration que nous avons réalisée, ensuite, par action



FIG. VII. — Épiderme de feuille d'*Iris* des jardins (variété *simile*) : corps globuleux fixés par le Regaud, colorés avec le noir Soudan B.

prolongée du rouge Soudan III à l'alcool. Le résultat est bien plus net quand on emploie le noir Soudan B. Après fixation pendant trois jours dans le liquide de Regaud et lavage prolongé, on voit ce colorant des lipides se dissoudre électivement dans les corps globuleux et leur donner en quelques heures une teinte noire foncée. La même coloration caractérise la nature lipidique du coagulum qui, sous l'action du fixateur, précipite dans la vacuole (Fig. VII).

Pour réaliser, sans fixation préalable, la coloration par le Soudan de ces concrétions intravacuolaires dans les feuilles d'*Iris*, nous suivons la méthode déjà employée pour colorer les concrétions lipidiques des écailles bulbaires de *L. candidum* (1). Un peu de Soudan III à l'alcool étant placé dans un verre de montre, on y plonge, successivement et en grand nombre, des lambeaux d'épiderme contenant des corps globuleux jusqu'au moment où ces corps ne se dissolvent plus. Pour arriver le plus rapidement possible à ce résultat, on peut n'employer qu'une petite quantité de Soudan si l'on prend la précaution d'égoutter les lambeaux d'épiderme après leur immersion. Dans le tissu épidermique, cependant, le colorant se fixe sur les membranes et le cytoplasme de sorte que, lorsque la solution alcoolique du Soudan ne dissout plus les corps globuleux intravacuolaires, elle peut être trop diluée pour donner une coloration assez intense. Il devient alors nécessaire d'ajouter, de nouveau, un peu de Soudan dissous à saturation dans de l'alcool à 70 degrés. Mais le réactif obtenu n'est pas utilisable directement car il dissoudrait les corps à colorer, aussi faut-il l'évaporer en partie à une douce chaleur pour concentrer de nouveau la solution alcoolique.

Pour réaliser plus aisément la coloration par le Soudan, nous immergeons d'abord, dans un volume minimum d'alcool à 70 degrés, des lambeaux d'épiderme, prélevés en grand nombre à la base des feuilles d'*Iris germanica*, variété *simile*. La solution alcoolique obtenue est d'abord filtrée, puis concentrée très fortement par évaporation; en même temps, nous ajoutons du Soudan III dissous à saturation dans de l'alcool à 70 degrés. Le Soudan concentré que nous obtenons ainsi étant introduit sous lamelle, les corps globuleux ne sont plus dissous et prennent en quelques minutes une teinte jaune orangé dans l'épiderme des feuilles d'*Iris*. En même temps, se trouvent colorées les granulations qui précipitent en grand nombre dans les vacuoles. Dans toutes ces opérations, nous prenons bien soin de vérifier d'abord que les lambeaux d'épiderme, prélevés à la base des feuilles du côté intérieur, ne présentent aucune pigmentation appréciable sous le microscope.

(1) La solution de Soudan III saturée, qui nous a permis de colorer les concrétions dans le Lis, dissout les corps globuleux de l'*Iris* sans leur donner la moindre coloration, ce qui nous fait déjà prévoir des différences notables dans la constitution chimique de ces corps.

Le mélange « nadi », habituellement utilisé pour mettre en évidence les corps gras, dissout rapidement les corps globuleux de l'*Iris* sans leur donner la moindre coloration. Cette dissolution provenant de l'excès de potasse entrant dans la composition du réactif, nous avons essayé de diminuer la quantité de cette substance normalement employée. En opérant avec 0,03 g. de potasse seulement, les 0,15 g. de naphthol α se dissolvent dans les 130 cc. d'eau après chauffage pendant une heure à feu doux. En mélangeant cette liqueur avec la solution (inchangée) de chlorhydrate de diméthyl-paraphénylène-diamine, le nadi obtenu ne dissout plus les concrétions intravacuolaires qui se colorent alors par le bleu d'indophénol naissant.

Cherchons maintenant à déceler la présence des stérides en effectuant, sur ces corps globuleux, la réaction de Liebermann. Pour rester très près des conditions dans lesquelles se produit cette réaction *in vitro*, préparons le mélange suivant : 3 cc. de chloroforme + 1 cc. d'anhydride acétique et conservons-le dans un tube soigneusement bouché pour éviter que l'humidité de l'air ne transforme l'anhydride en acide acétique. Dans une goutte de ce mélange, montons un lambeau d'épiderme sous lamelle en ajoutant une trace d'acide sulfurique concentré. Si le tissu présente des corps globuleux, on les voit se dissoudre lentement, mais, en même temps, une coloration verte générale apparaît et certains corps se montrent même colorés en vert avant de se dissoudre.

Pour obtenir plus de précision, il faut effectuer cette réaction de Liebermann comparativement sur des lambeaux d'épiderme (prélevés à la base des feuilles d'*Iris germanica*, variété *simile*) qui présentent des corps globuleux intravacuolaires et sur des lambeaux d'épiderme (prélevés vers le sommet des mêmes feuilles) qui n'en présentent pas. D'autre part, le résultat est plus net si l'on prend la précaution de laisser, au préalable, pendant plusieurs jours, le tissu se dessécher à l'air. En opérant la réaction comme il a été dit précédemment, nous obtenons une coloration jaune vert, virant rapidement au rouge sang et au vert foncé (rouge avec liseré vert ou auréole verte), dans l'épiderme contenant des corps globuleux, tandis qu'il apparaît à peine un léger brunissement dans l'épiderme ne contenant pas ces corps.

Nous allons, enfin, opérer *in vitro* la même réaction comparée sur des extraits alcooliques de ces épidermes. Signalons tout d'abord que, dans toutes ces expériences, pour obtenir avec plus de netteté une différence de coloration, nous prélevons toujours le tissu épidermique sur les feuilles du côté intérieur, le côté extérieur en effet présente déjà normalement une teinte rouge intense due à la présence de pigments anthocyaniques. Sur un grand nombre de feuilles d'*Iris germanica*, variété *simile*, prélevons donc avec une aiguille lancéolée des lambeaux d'épiderme vers la base d'une part et vers le sommet d'autre part. Après dessiccation à l'air, nous en prenons le même

poids (0,2 g.) et nous les immergeons séparément dans quelques centimètres cubes d'alcool à 70 degrés additionné de son volume d'eau, concentration suffisante pour dissoudre les corps globuleux intravacuolaires. Au bout de 24 heures, nous enlevons, en les égouttant soigneusement (nous les pressons fortement entre deux lames de verre), ces lambeaux d'épiderme et nous évaporons à sec les deux solutions alcooliques incolores obtenues. Reprenons dans les deux cas par 3 cc. de chloroforme, ajoutons 1 cc. d'anhydride acétique et versons enfin goutte à goutte l'acide sulfurique concentré. Dans la liqueur provenant du traitement de l'épiderme avec corps globuleux (base des feuilles) nous observons une coloration rouge sang à la partie inférieure, jaune vert au-dessus. Dans l'autre liqueur, l'épiderme traité ne contenant pas de corps globuleux (sommet des feuilles), apparaît seulement une légère teinte brune à la partie inférieure.

Les corps globuleux intravacuolaires seraient donc constitués, au moins en partie, par des phytostérides puisque nous obtenons sur le tissu épidermique les renfermant *et seulement lorsqu'il en renferme* un résultat positif par la réaction de Liebermann. Voyons maintenant si l'emploi de la digitonine nous permet de vérifier cette assertion. L'épiderme étant prélevé au-dessus de la base des feuilles d'*Iris germanica* ne présente pas de corps globuleux intravacuolaires : plaçons-en des lambeaux dans la solution alcoolique de digitonine. Les jours suivants, nous examinons sous le microscope ces fragments de tissu et nous constatons que la digitonine ne produit aucune précipitation dans les cellules. Quand il ne présente pas de corps globuleux, l'épiderme de ces feuilles ne paraît donc pas renfermer de phytostérol libre.

Au contraire, quand nous prélevons des lambeaux d'épiderme tout à fait à la base des feuilles, toutes les cellules contiennent des corps globuleux. Ayant vérifié la présence de ces corps dans quelques lambeaux d'épiderme, plaçons les fragments de tissu examinés dans l'alcool à 40 degrés contenant 1 p. 100 de digitonine. Au bout de plusieurs jours, nous constatons, dans la plupart des cellules, la présence d'un petit nombre de cristaux en aiguilles, groupés en amas rayonnants. Ces cristaux biréfringents, insolubles dans l'alcool à 70 degrés, dans l'acétone, et dans l'éther, solubles dans la pyridine, représentent le complexe que la digitonine vient de constituer avec le phytostérol libre dans les cellules. Le phytostérol libre, ainsi mis en évidence, entre, par conséquent, dans la constitution des corps globuleux dont nous avons préalablement constaté la présence dans le tissu.

Dans l'épiderme des pièces florales, comme dans l'épiderme des feuilles, la digitonine ne donne un résultat positif que si les cellules contiennent des corps globuleux. Nous vérifions ainsi la présence de phytostérol libre dans ces corps. Les stigmates de l'*Iris* étant aplatis en forme de lames, on peut les monter directement sous le microscope

pour étudier leur épiderme. Les corps globuleux apparaissent alors particulièrement nombreux dans les cellules situées à la base des stigmates, ils se raréfient graduellement vers la pointe où, même, ils sont totalement absents. En laissant, pendant plusieurs jours, les stigmates immergés dans la solution alcoolique de digitonine, nous constatons que les cristaux de stérol-digitonine se sont formés vers la base des stigmates, c'est-à-dire dans les cellules qui contenaient des corps globuleux. Ces cristaux apparaissent nettement situés dans la vacuole, la structure cellulaire étant, en général, conservée ici par la fixation qui s'opère dans l'alcool à 40 degrés en même temps que réagit la digitonine (Fig. VIII).

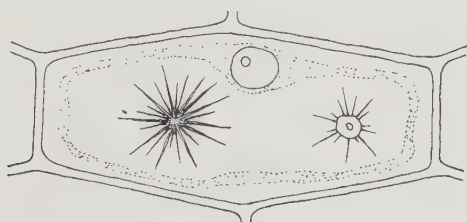


FIG. VIII. — Cellule de la base du stigmate de la fleur d'*Iris germanica* traité par la digitonine.

Nous avons montré, dans l'étude des concrétions lipidiques du bulbe de *L. candidum*, que l'on peut avec la digitonine mettre en évidence le phytostérol combiné si l'on place préalablement les lambeaux de tissu étudiés dans l'étuve, à 61 degrés par exemple, pendant une demi-heure. Dans ces conditions, si l'hydrolyse des lipides libère du phytostérol, on peut obtenir ensuite des cristaux du complexe stérol-digitonine. Nous remarquons, tout d'abord, que les corps globuleux dans l'épiderme des feuilles d'*Iris* se désagrègent plus rapidement, sous l'action de la chaleur, que les concrétions du bulbe de *Lis blanc*. Il suffit, en effet, de placer les lambeaux d'épiderme entre lame et lamelle dans une boîte de Pétri portée dans l'étuve à 55 degrés pendant une demi-heure pour constater que le corps globuleux régulièrement présent dans chaque cellule a totalement disparu; on observe, par contre, l'apparition d'un grand nombre de petits globules animés de mouvements browniens. Laissons maintenant les lambeaux d'épiderme dans l'étuve à 61 degrés pendant une demi-heure, puis plaçons-les dans l'alcool à 40 degrés contenant 1 p. 100 de digitonine. Après quelques jours, dans toutes les cellules, nous constatons la présence des cristaux aciculaires du complexe stérol-digitonine constituant de volumineux amas sphériques. Ces cristaux sont en bien plus grande quantité que ceux obtenus précédemment dans l'épiderme qui n'était pas passé dans l'étuve. En résumé,

quand l'épiderme des feuilles d'*Iris* présente des concrétions lipidiques intravacuolaires on peut déceler directement, avec la digitonine, le phytostérol libre puis, après passage dans l'étuve, la quantité bien plus grande de phytostérol qui se trouve en combinaison. Les concrétions lipidiques intravacuolaires de l'*Iris* renferment donc un phytostérol dont une faible proportion seulement se trouve en liberté.

Voyons maintenant si les corps globuleux intravacuolaires de l'*Iris* contiennent également des phospholipides, comme ceux du *Lis*. Remarquons, tout d'abord, que la présence de phospholipides expliquerait la fixation par le mélange de Regaud : la lécithine se trouve, en effet, insolubilisée par le bichromate de potassium et résiste ainsi à l'action dissolvante du formol. Après fixation dans le liquide de Regaud, nous avons traité par la méthode de Dietrich les lambeaux d'épiderme prélevés sur les feuilles et les fleurs d'*Iris*. Nous avons ainsi obtenu, localisée sur les corps globuleux, la coloration noire caractéristique des phospholipides. Une réserve cependant s'impose, étant donné la présence du composé phénolique, signalée par GUILLERMOND dans ces corps.

La meilleure preuve de la présence des phospholipides est certainement la formation de figures myéliniques. Nous avons étudié cette formation dans l'épiderme des écailles des bulbes de *Lis* et constaté qu'elle résulte régulièrement de la dessiccation, du passage des préparations dans l'étuve ou bien encore de l'action du réactif iodo-ioduré très concentré. Dans l'*Iris*, les faits sont beaucoup moins probants : on observe des figures myéliniques bien plus rarement et avec beaucoup moins de netteté. La dessiccation ou le séjour dans l'étuve ainsi que le montage dans les alcalis concentrés paraissent agir trop brutalement : dans ces conditions, le vacuome des cellules épidermiques d'*Iris* se concrétionne directement sous forme de minuscules grains sphériques très nombreux. L'action du réactif iodo-ioduré est, au contraire, progressive : en même temps que le corps globuleux prend la teinte rouge brun qui caractérise la lécithine, d'après ROMIEU, on observe, dans toute l'étendue de la vacuole, l'apparition d'une quantité innombrable de grains à peine visibles qui grossissent progressivement. Il se forme finalement des masses concrétionnées, fortement colorées en rouge brun et présentant des prolongements digitiformes, qui nous paraissent correspondre à des figures myéliniques épaissies, la lécithine paraissant peu abondante dans le vacuome ainsi concrétionné.

Nous pouvons donc conclure de cette étude que les concrétions intravacuolaires, dans l'épiderme des feuilles et des fleurs d'*Iris*, renferment une petite proportion de stérol libre, une plus grande quantité de stérides et relativement peu de phospholipides. Comme dans les concrétions du bulbe de *L. candidum* nous retrouvons un mélange de phytostérol et de phospholipides mais en proportions différentes,

ce qui rend compte des différences de solubilité observées, différences particulièrement accentuées quand nous comparons ces corps globuleux des *Iris* aux concrétions non cristallisées (stérinoplastes) du bulbe de Lis blanc. L'importance des phospholipides dans ces dernières concrétions intravacuolaires ressort nettement de l'expérience suivante. Des lambeaux d'épiderme prélevés, d'une part sur des écailles bulbaires de *Lilium candidum*, d'autre part sur des feuilles d'*Iris germanica* variété *simile*, sont d'abord immergés pendant un ou plusieurs jours dans une solution aqueuse à 10 p. 100 de chlorure de cadmium et de chlorure de magnésium (mélangés en parties égales). Nous les traitons ensuite, sous lamelle, par du Soudan III dissous dans de l'alcool méthylique additionné de chlorures de cadmium et de magnésium à saturation. (Dans ces conditions, les substances phospholipidiques ne doivent plus être solubles dans l'alcool puisque, bien au contraire, les sels employés précipitent ces substances en solution alcoolique). Dans l'épiderme du Lis, en opérant ainsi sous lamelle, nous constatons, en effet, que les concrétions restent en grand nombre insolubles et se trouvent colorées en jaune orangé par le Soudan. Dans l'épiderme d'*Iris*, au contraire, les corps globuleux correspondants sont encore rapidement dissous sans coloration.

Étudions, enfin, comme pour les bulbes de Lis, la constitution chimique des substances se trouvant concrétionnées dans les cellules épidermiques sous l'effet de la dessiccation. Au début de l'hiver, sur la face extérieure des feuilles de l'*Iris germanica*, variété *simile*, l'épiderme en partie décollé se dessèche progressivement. Dans chacune des cellules épidermiques le corps globuleux préexistant, en partie désagrégé, se trouve englobé dans une masse d'aspect spongieux constituant un réseau vaguement myéliniforme. Les lambeaux de tissu épidermique ainsi desséchés étant montés dans l'eau, toutes ces concrétions paraissent se gonfler fort peu et n'occupent qu'une place très réduite dans l'axe des cellules, contrairement à ce que nous avons observé dans les bulbes de Lis. L'ensemble de ce corps spongieux apparaît coloré en rouge brun par le réactif iodo-ioduré et, après fixation dans le bichromate de potassium, en noir par l'hématoxyline acétique de Smith-Dietrich ou le noir Soudan B. Nous trouvons donc encore des phospholipides dans le vacuome des cellules épidermiques en voie de dessiccation. Au contraire, en plaçant cet épiderme dans la digitonine en solution à 1 p. 100 dans l'alcool à 40 degrés nous allons constater l'absence complète de phytostérol.

Dans la même solution de digitonine nous plaçons, pendant le même temps, des lambeaux d'épiderme prélevés d'une part sur des feuilles fraîches et présentant des corps globuleux intravacuolaires, d'autre part sur les feuilles en voie de dessiccation et montrant des concrétions myéliniformes. Comme nous l'avons vu précédemment, dans les cellules épidermiques où se trouvent des corps globuleux,

on observe, au bout de quelques jours, la formation de cristaux du complexe digitonine-stérol. Ces cristaux ne se forment pas, au contraire, dans l'épiderme en voie de dessiccation : le stérol libre est donc ici totalement absent.

Mais nous avons vu qu'après passage du tissu épidermique dans l'étuve pendant une demi-heure à 61 degrés, on peut mettre en évidence, par action de la digitonine, le phytostérol qui se trouvait en combinaison. L'élévation de température réalise en effet l'hydrolyse des stérides et nous permet ainsi de mettre en évidence le stérol libéré. Nous avons placé dans l'étuve, pendant le même temps et à la même température, des lambeaux d'épiderme prélevés sur des feuilles fraîches et sur des feuilles desséchées, puis nous avons fait réagir la digitonine. L'épiderme frais, ainsi traité, montre dans chacune de ses cellules de nombreux cristaux du complexe digitonine-stérol tandis que, dans l'épiderme desséché, on peut encore constater la présence des corps myéliniformes mais la digitonine n'a pas constitué de complexe cristallin. A peine trouve-t-on dans de rares cellules épidermiques quelques minuscules cristaux. L'épiderme des feuilles sèches d'*Iris* ne renferme plus le stérol libre et les stérides dont nous avons constaté la présence dans les vacuoles des cellules épidermiques non desséchées. La dessiccation produit ainsi, dans les feuilles d'*Iris*, les mêmes modifications étudiées déjà dans le bulbe de *Lis*, la teneur du vacuome en stérol et stérides apparaissant encore liée à l'état plus ou moins avancé de deshydratation.

Conséquences pour la classification **des principales espèces d'*Iris*.**

Ayant ainsi étudié les corps globuleux intravacuolaires dans les fleurs d'*Iris germanica*, nous avons effectué le même travail sur les corps analogues que nous avons pu trouver dans les fleurs des diverses espèces d'*Iris*, cultivées côte à côte à l'École de Botanique. Il est facile de faire cette étude en prélevant les stigmates pour les monter entre lame et lamelle et l'observation du gros corps globuleux, presque toujours intensément coloré, que peut contenir chaque cellule épidermique, ne présente pas la moindre difficulté. Alors que dans les feuilles, comme nous le verrons plus loin, on retrouve difficilement ces corps pendant l'été, au contraire leur présence dans les pièces florales reste constante pendant toute la durée de la floraison chez une espèce déterminée. Nous pouvons donc établir un classement des diverses espèces d'*Iris* en utilisant ce nouveau caractère : présence ou absence des concrétions lipidiques intravacuolaires dans l'épiderme du stigmate.

La présence de ces concrétions lipidiques constitue un caractère d'ordre morphologique et chimique à la fois. La cytologie nous fournit ainsi le moyen d'établir un classement sur une donnée immédiate de

PRÉSENCE DES CORPS GLOBULEUX INTRAVACUOLAIRES

	sur toute l'étendue des stigmates. —	à la base des stig- mates seulement. —
(<i>Pogoniris</i>)	<i>I. germanica</i> <i>florentina</i> <i>pallida</i> <i>variegata</i> <i>chamaeris</i> <i>aphylla</i> <i>mellita</i> <i>plicata</i> <i>sambucina</i> <i>pumila</i>	<i>I. lutescens</i>
(<i>Regelia</i>)	<i>I. stolonifera</i> <i>falcifolia</i>	
(<i>Oncocyclus</i>)	<i>I. susiana</i>	

morphologie florale en correspondance certaine avec la nature chimique des espèces étudiées. De plus, le genre *Iris* se trouve très nettement subdivisé dans les deux tableaux ci-dessus, alors qu'il est actuellement dissocié en sections à peu près également distantes par les botanistes et, bien au contraire, étiré en une série d'espèces étroitement soudées par les chimistes [6].

Une des espèces étudiées : *I. lutescens* reste cependant à cheval sur la cloison établie. Dans les fleurs de cette espèce, les corps globuleux n'existent, dans les cellules du stigmate, que le long de la nervure principale. Cette exception mérite, pensons-nous, l'admission d'un compartiment spécial. Dans deux autres espèces : *I. dichotoma* et *I. ensata*, également mises à part, on ne trouve absolument aucune concrétion intravacuolaire dans le stigmate de la fleur jeune encore en bouton mais, dès l'éclosion, apparaissent des amas finement granuleux, intensément colorés par l'anthocyane.

Nous laissons de côté le petit groupe des *Iris* présentant un bulbe et nous limitons ce classement à l'ensemble beaucoup plus homogène des *Iris* à rhizomes. En marge du tableau et entre parenthèses nous indiquons les noms des sections établies par les botanistes [17 et 18]. On peut remarquer tout d'abord que notre classement ne dissocie aucune de ces sections mais les range, au contraire, entièrement de part et d'autre de la cloison établie. De plus, nous retrouvons groupées les trois sections : *Pogoniris*, *Regelia* et *Oncocyclus* que caractérisent leurs sépales barbus. Notre étude histochimique confirme donc la

ABSENCE DES CORPS GLOBULEUX INTRAVACUOLAIRES

	Les stigmates ne présentant aucun corps concrétionné dans les vacuoles de leurs cellules épidermiques.	Des granulations intravacuolaires apparaissant dans l'épiderme des stigmates après l'ouverture des fleurs.
	—	—
(<i>Evansia</i>)	<i>I. × Paltec</i>	
(<i>Pardanthopsis</i>)	<i>I. tectorum</i>	<i>I. dichotoma</i>
	<i>I. pseudacorus</i>	
	<i>carthalinix</i>	
	<i>ochroleuca</i>	
	<i>chrysographes</i>	
	<i>graminea</i>	
	<i>fulva</i>	
	<i>pabularia</i>	<i>I. ensata</i>
	<i>Kaempferi</i>	
(<i>Apogon</i>)	<i>sibirica</i>	
	<i>aurea</i>	
	<i>versicolor</i>	
	<i>virginica</i>	
	<i>Douglasiana</i>	
	<i>humilis</i>	
	<i>setosa</i>	
	<i>Bulleyana</i>	
	<i>fœtidissima</i>	
	<i>Delavayi</i>	

valeur de la classification généralement admise pour les *Iris* rhizomateux, nous concluons avec SIMONET que cette classification est rationnelle et naturelle [97]. D'après ce dernier auteur les *Pogoniris* paraissent occuper caryologiquement et génétiquement une position centrale et primitive, aussi les plaçons-nous en tête du classement. Enfin la section *Evansia* reste assez proche des *Pogoniris* puisque des croisements ont pu être réussis (*I. × Paltec* = *I. pallida* × *I. tectorum*) tandis que nous mettons le plus possible à part les espèces *Apogon*, aucune d'entre elles n'ayant jamais pu être hybridée avec les plantes des autres sections [98].

La présence ou l'absence des corps globuleux intravacuolaires s'accorde ainsi avec la séparation établie par les botanistes entre les sections les plus différentes des *Iris* rhizomateux. Un caractère microchimique vient ainsi doubler les caractères morphologiques

apparents. Mais la présence des concrétions lipidiques intravacuolaires est souvent déterminée, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, par les conditions de température dans lesquelles s'effectue la végétation. Dans les fleurs d'*Iris* pendant la durée de la floraison normale on n'observe pas de variations notables : la présence des corps globuleux dans le stigmate est, par exemple, continue dans les fleurs d'*I. germanica* les plus précoces ou les plus tardives. Si nous considérons les différentes sections nous établissons au contraire un rapport avec les conditions de température. D'une manière générale, en effet, les *Iris Apogon* (qui ne présentent pas de corps lipidiques intravacuolaires) ont une floraison plus tardive que les *Pogoniris*. Ainsi peut être expliqué physiologiquement le parallélisme remarquable existant entre le classement établi et l'ordre chronologique de floraison des diverses espèces.

FEUILLES DE *HAWORTHIA CYMBIFORMIS*

Historique.

Des corps analogues à ceux que GUILLIERMOND a étudiés dans l'*Iris* ont été découverts par SOSTER dans les feuilles de l'*Haworthia cymbiformis* [99]. On les trouve surtout vers la pointe des feuilles. Ce sont des sphères plus ou moins régulières, plus grandes que le noyau, présentant parfois une structure spongieuse. Parfois aussi l'on peut distinguer, dans ces corps, une zone centrale et une périphérique, de réfringences différentes. Comme GUILLIERMOND l'a montré dans l'*Iris*, SOSTER obtient dans les cellules épidermiques des feuilles d'*Haworthia*, par coloration vitale ou plasmolyse, la précipitation de corps globuleux ayant le même aspect que le globule préexistant. Ces corps résultent donc aussi de la condensation d'une substance colloïdale se trouvant dans la vacuole à l'état de pseudo-solution.

Ces corps sont solubles dans l'alcool éthylique, même très dilué, ainsi que dans les alcools méthylique et butylique. Ils sont rapidement dissous dans l'acide acétique et dans l'acétone, même diluée, ainsi que dans la solution aqueuse d'hydrate de chloral et dans le formol. Ce dernier solvant étendu à 10 p. 100 laisse subsister les corps étudiés par SOSTER sous forme de vésicules présentant un contour irrégulier.

SOSTER étudie soigneusement l'action des solvants organiques non miscibles avec l'eau sur le tissu épidermique des feuilles d'*Haworthia* qu'il a laissé préalablement sécher à l'air. Au bout de quelques minutes d'immersion dans l'éther on observe le gonflement et la vésiculation des corps globuleux; après 12-24 heures d'action on ne retrouve plus qu'une étroite zone périphérique. Le chloroforme et la benzine ont une action moins profonde mais du même ordre; il en est de même

avec le xylol, le toluène et l'éther de pétrole. Ces solvants organiques paraissent avoir une action plus désorganisatrice que dissolvante : au moins une partie des constituants chimiques des corps globuleux serait insoluble dans ces liquides.

Après fixation dans une solution de bichromate de potassium à 3 p. 100 pendant 24-48 heures, SOSTER a pu constater que les corps étudiés ne se dissolvaient plus dans l'alcool. Ce résultat lui permet d'obtenir une coloration avec le Soudan. Ces corps réduisant également l'acide osmique, SOSTER cherche à déceler la présence de phospholipides par la méthode de Loisel. Il souligne le peu de spécificité des colorations obtenues avec le vert de méthyle, le violet de gentiane, le bleu de toluidine, etc...

Résultats de nos recherches.

Nous vérifions, d'abord, en effectuant des colorations vitales, que les corps décrits par SOSTER correspondent bien à des concrétions intravacuolaires. Nous retrouvons ensuite, comme dans le *Lis* et l'*Iris*, une grande solubilité de ces corps dans l'alcool, l'acide acétique, l'acétone et l'hydrate de chloral. Comme ceux de l'*Iris* les corps globuleux de l'*Haworthia* sont rapidement dissous par le formol. Le rapprochement avec les concrétions intravacuolaires du bulbe de *Lilium candidum* se précise encore davantage en ce qui concerne l'action plus désorganisatrice que dissolvante de l'éther.

La fixation par le bichromate de potassium à 3 p. 100 rend bien les concrétions intravacuolaires des feuilles d'*Haworthia* insolubles dans l'alcool, mais leur confère, en même temps, une coloration jaune plus ou moins intense, passant parfois au rouge orangé. Ils est difficile d'obtenir alors une coloration nette avec le rouge Soudan. Comme pour les corps de l'*Iris*, nous avons employé le noir Soudan B : après fixation pendant deux jours dans le bichromate de potassium à 3 p. 100 nous obtenons, avec ce nouveau colorant spécifique des lipides, une teinte noire intense des corps intravacuolaires.

Par contre, il nous a été impossible d'obtenir une coloration régulière par le bleu d'indo-phénol naissant; même en diminuant le plus possible la quantité de potasse entrant dans la composition du nadi les corps étudiés se dissolvent encore : ils présentent alors un aspect pelotonné en même temps qu'une légère teinte bleue.

Nous avons vérifié que ces corps présentent les colorations qui permettent, d'après LOISEL, de distinguer la lécithine des graisses neutres. D'autre part, après fixation par le bichromate de potassium, en traitant ces corps par la méthode de Dietrich, nous obtenons la teinte noire caractéristique des phospholipides. Enfin le réactif iodo-

ioduré produit une coloration jaune qui correspond à la réaction iodophile de la lécithine.

Les concrétions intravacuolaires, dans les feuilles d'*Haworthia*, seraient encore constituées par des phospholipides. Mais, par contre, il nous a été impossible de déceler nettement la présence de phytostérol. L'épiderme de ces feuilles placé dans la digitonine à 1 p. 100 dans l'alcool ne montre après plusieurs jours aucun cristal; cependant quand on place les fragments de tissu dans l'étuve, on peut observer ensuite, par action de la digitonine, l'apparition de quelques cristaux aciculaires dans certaines cellules.

CONCLUSION

Les cellules végétales vivantes peuvent donc renfermer, dans leurs vacuoles, des corps sphériques particulièrement réfringents, constitués par des lipides (phospholipides + phytostérides), nettement distincts des glycérides inclus dans le cytoplasme.

La présence de corps lipidiques intravacuolaires a été constatée par GUILLIERMOND dans les cellules de la coiffe des racines de Blé et d'Orge, dans la racine de Jacinthe et dans les filaments de *Saprolegnia dioica* [34]. D'autre part, en cultivant des plantules d'Orge sur milieux glucosés, GAUTHERET a constaté la formation, dans les vacuoles, de gros corps globuleux qui fixent électivement les colorants des mucilages (rouge de ruthénium, bleu coton, hématoxyline de Delafield) mais se montrent essentiellement constitués par des lipides. GAUTHERET n'a pu déceler la présence de stérol, par contre il caractérise les phospholipides entrant dans la constitution des corps étudiés [24]. Contrairement à ce que nous avons observé pour les concrétions lipidiques intravacuolaires dans le Lis, l'*Iris*, l'*Haworthia*, les corps étudiés par GUILLIERMOND et GAUTHERET n'étant pas dissous par l'alcool, peuvent être colorés directement par le Soudan.

Les fleurs de *Delphinium* (et d'autres Renonculacées) renferment d'après un travail récent de SCHÄRINGER [95], dans l'épiderme des pièces du périanthe, des corps biréfringents ressemblant beaucoup aux concrétions intravacuolaires du bulbe de *Lilium candidum*. Ces corps, solubles dans l'alcool, l'éther, l'acétone, le formol, la potasse, l'acide acétique, sont colorés en brun noir par l'acide osmique, en brun par le réactif iodo-ioduré. L'auteur n'a pas obtenu (probablement à cause de leur solubilité dans l'alcool) la coloration de ces corps par le Soudan mais il a constaté leur transformation en figures myéliniques; aussi pense-t-il qu'ils sont vraisemblablement constitués par des lipides : cholestérides et lipines (phospholipides).

En citant les résultats partiels de notre travail, publiés sous forme de notes dans les Comptes rendus de la Société de Biologie, SAVELLI

(prenant pour ses éléochloroplastes l'appellation de stérinoplastes) propose de nommer *stérinosomes* les corps intravacuolaires étudiés ici dans le bulbe de *Lilium candidum* [93]. Mais il vaut mieux, pensons-nous, éviter une dénomination trop précise qui ne correspondrait pas à l'ensemble des résultats obtenus.

La constitution chimique des corps lipidiques intravacuolaires apparaît, en effet, extrêmement variée. Dans le bulbe de Lis blanc, nous distinguons, dans les écailles fraîches, les calculs de phytostérol et les concrétions ordinaires amorphes (phytostérides+phospholipides); dans les écailles sèches, nous retrouvons des phospholipides mais pas de phytostérides. Les corps globuleux intravacuolaires de l'*Iris* paraissent être surtout formés de phytostérides tandis que les corps analogues de l'*Haworthia* renfermeraient seulement des phospholipides. Il vaut mieux donc ne pas chercher une dénomination trop précise pour ces corps et les appeler simplement : *concrétions lipidiques intravacuolaires*.

Nous verrons, d'ailleurs, dans la suite de ce travail, que l'existence même de ces corps est essentiellement inconstante. Leur importance est plutôt d'ordre physiologique que morphologique et il ne saurait être question de les élever au rang des formations permanentes de la cellule végétale.

LES CONCRÉTIIONS LIPIDIQUES INTRAVACUOLAIRES ET LA TEMPÉRATURE

BULBE DE LILIUM CANDIDUM

Il existe donc, d'une façon constante, dans les bulbes du genre *Lilium*, des lipides qui sont localisés dans les vacuoles des cellules épidermiques et se trouvent concrétionnés dans les écailles en voie de dessiccation. Mais c'est seulement dans le bulbe de l'espèce *L. candidum* que ces corps lipidiques forment déjà des concrétions dans les jeunes écailles. Cherchons l'explication de cette particularité.

Pour déterminer dans quelles conditions de végétation ils apparaissent, nous allons, en sens inverse, rechercher comment on peut faire disparaître ces corps lipidiques concrétionnés dans les écailles normales, non desséchées, du bulbe de *L. candidum*. En portant à l'ébullition, sous lamelle, des lambeaux d'épiderme montés dans l'eau, Marcel MIRANDE obtenait la désagrégation des concrétions lipidiques intravacuolaires (stérinoplastes). Dès le début de l'ébullition, on observe en effet la transformation des concrétions en amas globulaires d'aspect cristallin colorés en jaune brun. Mais si l'ébullition dure quelque peu toutes ces masses cristallines se désagrègent et il ne subsiste plus, des concrétions lipidiques intravacuolaires, que quelques petits cristaux aciculaires.

Nous obtenons le même résultat en soumettant l'épiderme, placé entre lame et lamelle dans une boîte de Pétri, pendant un certain temps à l'action d'une température déterminée dans l'étuve (Fig. IV). Nous plaçons en même temps dans la boîte de Pétri un godet à demi plein d'eau pour éviter de dessécher la préparation. La désagrégation des concrétions lipidiques intravacuolaires ne se produit, en effet, que dans un épiderme suffisamment hydraté. D'autre part, cette désagrégation ne s'effectue pas quand on place directement les lambeaux d'épiderme dans l'eau du godet : c'est ainsi qu'à 59 degrés au bout de trois heures on observe encore, dans ces conditions, des concrétions d'aspect normal dont le noyau présente cependant le plus souvent une structure cristalline. Nous avons de plus chauffé les lambeaux d'épiderme, montés dans l'eau entre lame et lamelle, dans une enceinte saturée de vapeur d'eau et nous n'avons pas davantage obtenu la désagrégation des concrétions lipidiques intravacuolaires. C'est que, placé dans l'eau ou dans la vapeur d'eau, l'épiderme ne doit plus trouver une quantité d'air suffisante pour que la transformation des corps lipidiques puisse s'effectuer.

Pour vérifier cette idée nous pouvons réaliser l'expérience suivante. Prélevons deux lambeaux d'épiderme sur la même écaille bulbaire et montons-les séparément entre lame et lamelle. Pour mettre le plus possible l'une de ces préparations à l'abri de l'air, nous lutons, avec de la cire à cacheter, l'un des bords de la lamelle, sous laquelle est placé à sec un lambeau d'épiderme, puis nous introduisons de l'eau préalablement bouillie, en même temps que nous achevons de luter les bords de la lamelle. De cette façon, nous pouvons enfermer l'un des deux lambeaux de tissu épidermique sous lamelle sans introduire de bulles d'air. Les deux lames étant placées dans la même boîte de Petri dans l'étuve à 54 degrés pendant trois heures, l'épiderme placé sous lamelle non lutée ne montre plus que des amas de cristaux provenant de la désagrégation des corps lipidiques tandis que, dans l'épiderme placé sous lamelle lutée, les mêmes corps sont à peu près parfaitement conservés.

Nous pouvons effectuer des expériences analogues en opérant, non plus sur des fragments de tissu épidermique, mais sur des écailles entières. Enfermons-les toujours avec un godet contenant de l'eau, dans les boîtes de Petri que nous plaçons dans l'étuve à 40 degrés. Nous prélevons de temps en temps un lambeau d'épiderme sur ces écailles pour l'examiner sous le microscope. En opérant ainsi nous avons pu constater au bout de trois jours la disparition totale des concrétions lipidiques intravacuolaires et la formation, dans toutes les cellules épidermiques, de paquets d'aiguilles cristallines. Si nous recommençons maintenant la même expérience, toujours à 40 degrés mais en remplaçant dans le godet l'eau par de l'alcool à 96 degrés, au bout de 17 heures se trouve déjà réalisée la désagrégation complète des concrétions. Les vapeurs d'alcool, par leur action dissolvante probablement, produisent donc une accélération du phénomène. Plaçons enfin dans un de ces godets de la craie avec de l'acide sulfurique étendu pour obtenir un dégagement de gaz carbonique et, dans un autre, de l'oxylithe sur du papier filtre humide, produisant ainsi de l'oxygène. Transportons les boîtes de Petri contenant ces godets et des écailles bulbaires dans l'étuve à 40 degrés. Au bout de 24 heures nous retrouvons encore des concrétions lipidiques intravacuolaires dans l'épiderme de l'écaille en présence de gaz carbonique tandis que, sous l'influence du dégagement d'oxygène, l'autre écaille ne présente plus aucune concrétion, les cellules épidermiques apparaissant remplies de cristaux en aiguilles.

Cette désagrégation des corps lipidiques intravacuolaires dans les lambeaux d'épiderme placés dans l'étuve résulte donc, probablement indirectement, d'un ensemble de réactions d'hydrolyse et d'oxydation. La vitesse de cette transformation chimique correspond à l'inverse du temps nécessaire pour l'obtenir à la température correspondante. Par conséquent, en déterminant pour chaque température le temps

correspondant à la désagrégation complète des concrétions nous obtenons la courbe de la vitesse du phénomène par rapport à la température.

Nous mesurons le temps maximum au bout duquel on n'observe pas encore de cristaux et le temps minimum au bout duquel les concrétions sont complètement transformées en amas cristallins; le calcul nous donne alors le temps moyen, juste suffisant pour que la désagrégation soit produite. La précision du résultat dépend évidemment du nombre d'expériences successives qui permettent de rapprocher les temps minimum et maximum. D'autre part, les chiffres obtenus ne sont valables que pour les écailles normales moyennes du bulbe : les temps se trouveraient augmentés si l'on opérait sur des écailles extérieures qui sont près de se dessécher; ils seraient au contraire diminués pour les écailles les plus centrales du bulbe.

Nous plaçons une boîte de Petri en permanence dans l'étuve pour que l'équilibre de température soit toujours réalisé. En opérant rapidement nous enfermons chaque fois dans cette boîte une nouvelle écaille bulbaire et nous déterminons, dans une série d'expériences, les temps qui permettent ou non d'obtenir la désagrégation des concrétions lipidiques intravacuolaires. Par tâtonnement nous nous rapprochons ainsi de la valeur exacte du temps correspondant à la désagrégation complète. En opérant toujours suivant la même technique nous avons déterminé pour chaque température T , exprimée en degrés centigrades, un temps trop faible tm et un temps trop fort tM . La moyenne de ces deux résultats donne le temps moyen t que nous exprimons en minutes. Pour la construction des courbes nous avons également calculé : la vitesse v du phénomène en prenant une échelle de grandeur telle que $v = \frac{1}{t} \times 100$, le logarithme du temps

$\log. t$ et enfin l'inverse de la température multiplié par cent : $\frac{1}{T} \times 100$.

T	tm	tM	t	v	$\log. t$	$\frac{1}{T} \times 100$
65,8	15	20	17	5,88	1,230	1,520
63,7	20	23	22	4,55	1,342	1,570
63,4	23	25	24	4,17	1,380	1,577
62,6	25	30	26	3,85	1,415	1,600
61,0	28	30	29	3,45	1,462	1,640
60,0	30	40	33	3,03	1,518	1,660
58,5	45	60	50	2,00	1,699	1,710
58,0	60	70	65	1,54	1,813	1,724
56,4	75	90	85	1,18	1,930	1,770
55,7	100	110	105	0,95	2,021	1,800
53,0	110	135	120	0,83	2,079	1,890
50,0	210	260	240	0,42	2,380	2,000
48,0	360	450	420	0,24	2,623	2,080
45,0	960	1.080	1.020	0,10	3,009	2,220
44,5	1.080	1.260	1.200	0,08	3,079	2,250
40,0	4.200	4.500	4.320	0,023	3,635	2,500

Considérons d'abord les résultats inscrits dans les deux dernières colonnes à la droite du tableau. Ils nous permettent de construire une courbe représentative du phénomène qui se révèle être une ligne droite (voir graphique I). Une proportionnalité directe existe donc entre $\log. t$ et $\frac{1}{T}$. Nous établissons entre ces valeurs une relation correspondant à la loi de VAN'T HOFF et s'exprimant ici d'après nos calculs sous la forme :

$$\frac{5,52}{T} = 5,5 + 2,3 \log. t$$

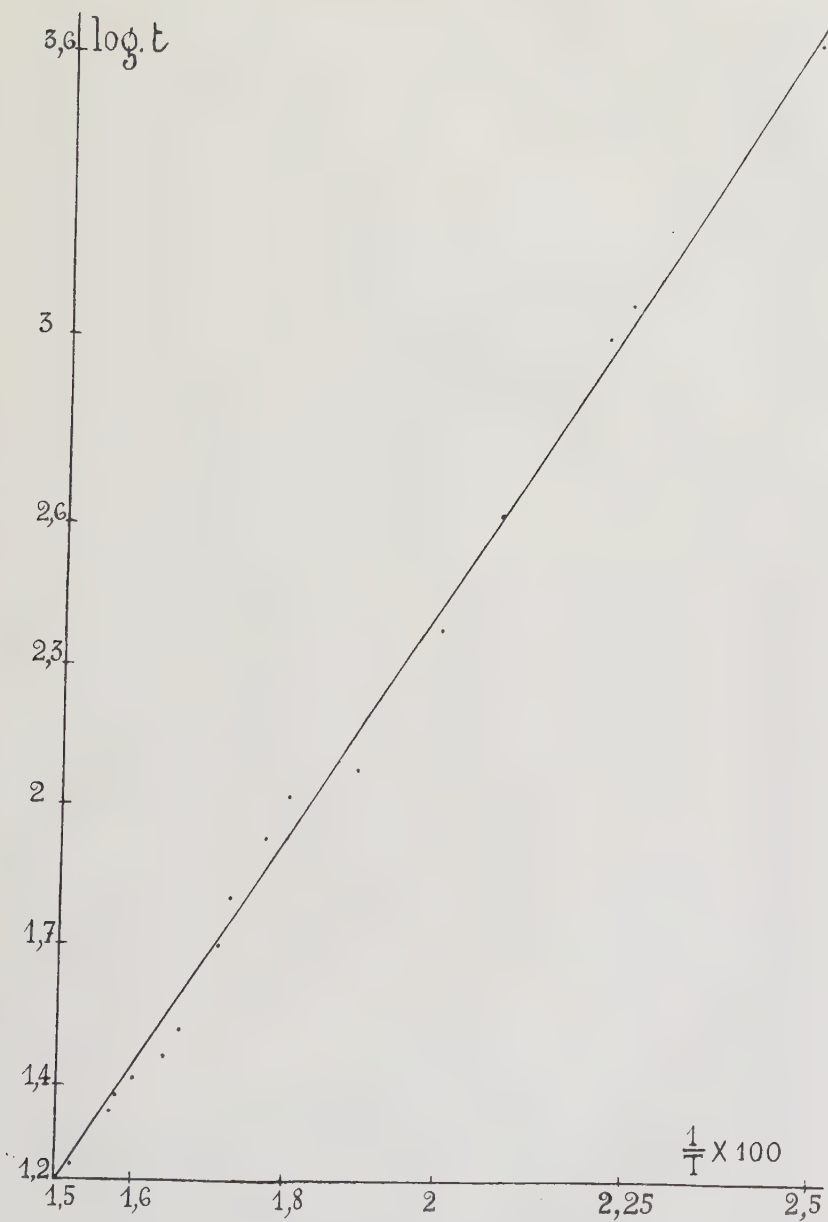
Cette formule permet de retrouver les divers résultats inscrits au tableau précédent. Elle permet même de prévoir les résultats que nous établirons dans la suite de nos expériences. A la température de 38 degrés notamment, nous pouvons déjà connaître par le calcul le temps correspondant à la désagrégation des concrétions lipidiques : 8.404 minutes, soit près de six jours.

En construisant la courbe logarithmique précédente nous avons ramené l'ensemble du phénomène à une application de la loi de VAN'T HOFF. Considérons maintenant, non plus les logarithmes, mais directement les valeurs de $\frac{1}{t}$, c'est-à-dire de la vitesse v , par

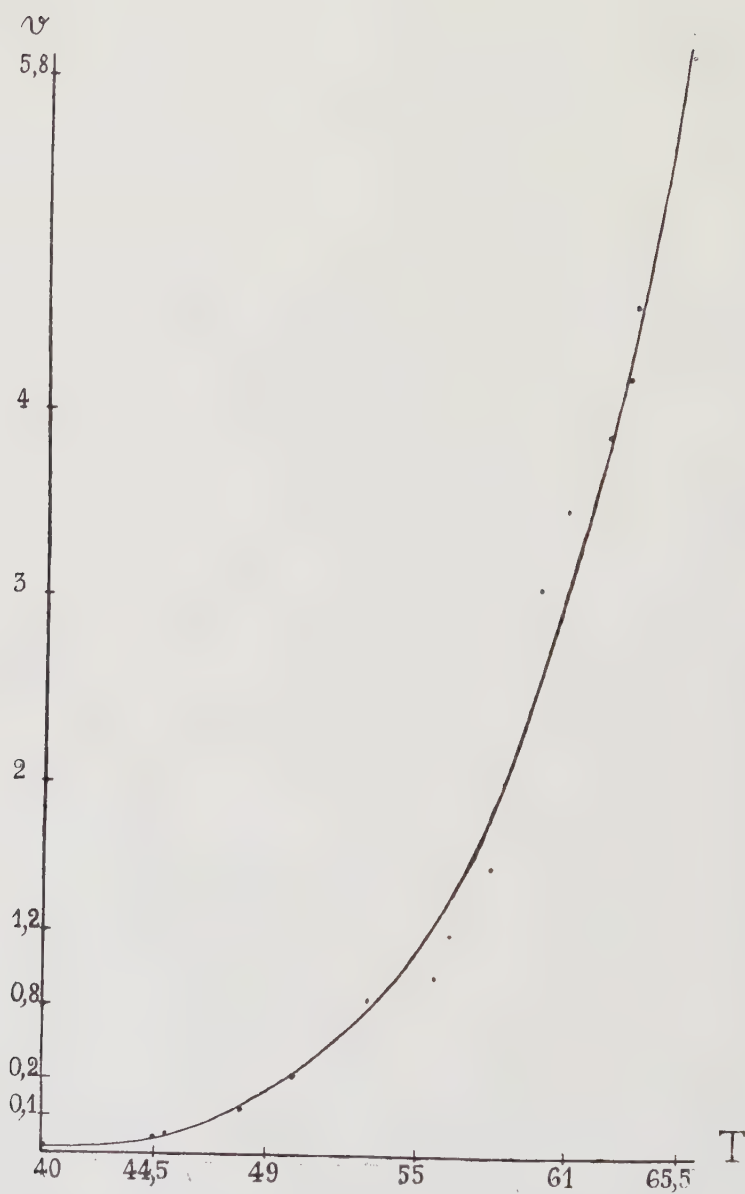
rapport à la température T . Avec ces valeurs nous construisons une courbe qui se relève rapidement quand la température croît (voir graphique II). En sens inverse nous dirons que : la vitesse de désagrégation des concrétions lipidiques intravacuolaires diminue d'abord à peu près régulièrement quand la température descend de 65 à 60 degrés, puis que, progressivement, cette diminution s'accélère à mesure que la température s'abaisse. Quand nous descendons ainsi jusqu'à 40 degrés, la courbe devient presque tangente à l'axe des abscisses : la vitesse de désagrégation tend donc à devenir pratiquement nulle.

Par conséquent, l'allure de cette courbe nous conduit à envisager une stabilité de plus en plus grande des concrétions lipidiques quand la température s'abaisse. La présence de ces corps, dans les écailles bulbaires non desséchées, peut, dès lors, être logiquement reliée à des conditions de température. Rappelons que MIRANDE souligne les caractères particuliers de l'espèce *L. candidum* qui se distingue, dit-il, très nettement dans le genre, notamment par son mode bien spécial de végétation hivernale. Ainsi le bulbe de *L. candidum* végétant en pleine saison froide, la présence remarquable des concrétions lipidiques intravacuolaires représenterait un effet des conditions de la végétation à basse température.

La présence de corps lipidiques concrétionnés dans les vacuoles des cellules épidermiques dans les écailles des bulbes de *L. candidum* résulterait de l'abaissement de la température pendant la végétation. Dès que cette température est artificiellement élevée nous



GRAPHIQUE I. — Représentation du phénomène par la droite établissant une proportionnalité directe entre le logarithme du temps t et l'inverse de la température T .



GRAPHIQUE II. — Représentation du phénomène par la courbe des variations de la vitesse v en fonction de la température T .

pouvons constater la disparition des concrétions lipidiques. Mais il nous faut maintenant étudier de plus près les modifications qui peuvent ainsi être provoquées par les changements de température dans les cellules vivantes. C'est qu'en effet, lorsque nous obtenons la désagrégation des concrétions lipidiques dans l'épiderme des écailles placées dans l'étuve au-dessus de 45 degrés, les cellules sont mortes. Mais, à 45 degrés, quand le tissu épidermique ne montre plus que des cristaux aciculaires en aigrettes, c'est-à-dire après 17 heures de séjour dans l'étuve, on peut encore colorer vitalement les cellules qui montrent, dans ces conditions, un début de plasmolyse. Au-dessous de cette température on obtient normalement la désagrégation complète des concrétions intravacuolaires dans les cellules épidermiques restées vivantes. C'est ainsi qu'à 40 degrés au bout de trois jours, les écailles ne montrent que des cristaux en aigrettes dans leurs cellules épidermiques colorables vitalement par le rouge neutre. On peut aussi s'assurer de la vitalité du tissu en provoquant une plasmolyse par addition sous lamelle d'une solution concentrée de chlorure de sodium.

Cependant pour analyser les effets produits par la végétation à basse température nous allons, au lieu d'opérer avec des écailles séparées, voir les modifications cytologiques produites dans le bulbe entier. Dans les bulbes conservés au laboratoire à la température moyenne de vingt degrés nous avons, depuis longtemps, constaté que les concrétions deviennent en un ou deux mois extrêmement rares et présentent, lorsqu'elles subsistent encore, des formes globuleuses lobées; elles paraissent alors dissociées en zones concentriques. En cultivant les bulbes en pot à une température moyenne de vingt degrés nous n'avons plus retrouvé, en janvier, les concrétions dont nous avons constaté la présence normale en octobre. Enfin, nous avons étudié deux bulbes de *Lilium candidum* provenant du Maroc, d'une lignée cultivée à Rabat depuis douze ans, pour voir les modifications cytologiques dues à la végétation dans un pays chaud. Dans ces bulbes nous n'avons pu trouver une seule concrétion de forme normale (stérino-plaste) (1).

Nous avons alors placé des bulbes de *L. candidum* dans l'étuve à 38 degrés. Au bout de cinq jours on observe encore dans l'épiderme quelques concrétions lipidiques intravacuolaires mais le sixième jour, en même temps que les concrétions disparaissent, on voit apparaître des cristaux aciculaires, groupés en aigrettes et solubles dans les alcalis, que nous avons envisagés comme représentant les acides gras libérés par l'hydrolyse. Dans certaines écailles on ne trouve ni concrétions, ni même cristaux, mais on constate alors dans l'épiderme qui, norma-

(1) On trouve seulement dans ces bulbes de *L. candidum* cultivés au Maroc les « calculs » de phytostérol dans les écailles périphériques et, comme pour tous les *Lis*, des figures myéliniques et cordons pelotonnés dans les écailles sèches.

lement, n'en renferme jamais. la présence de nombreux grains d'amidon. Ainsi la disparition des concrétions lipidiques dans les cellules épidermiques est accompagnée d'une formation de glucides, condensés même en grosses molécules d'amidon. Avec le réactif iodo-ioduré faiblement concentré ou mieux l'eau iodée on observe toujours une coloration bleue de cet amidon naissant : jamais on ne réalise de colorations rouges qui pourraient faire soupçonner la présence des termes inférieurs de la condensation amylogène. Ce dernier résultat est en accord avec les conclusions que nous avons formulées dans un travail précédent [81]. Précisons ici que la coloration bleue de l'amidon par l'eau iodée se produit beaucoup plus rapidement quand le tissu est au préalable porté à l'ébullition sous lamelle. En rapport avec cette formation de glucides signalons un envahissement général des bulbes placés dans l'étuve par les moisissures alors que MIRANDE a souligné la résistance du bulbe normal en attribuant un rôle anti-infectieux à la « liliostérine ».

Nous pouvons constater, par contre, dans l'épiderme de ces bulbes la persistance des globules lipidiques intracytoplasmiques. Avec le réactif iodo-ioduré moyennement concentré, nous pouvons suivre, en effet, la désagrégation des concrétions lipidiques intravacuolaires colorées en jaune et constater la formation d'amidon présentant une teinte violette, tandis que subsiste le globule oléagineux incolore présent dans chacune des cellules épidermiques. Avec le Soudan III en solution dans de l'alcool à 70 degrés nous obtenons une coloration jaune orangé de ces globules lipidiques intracytoplasmiques, parfaitement conservés dans l'épiderme des bulbes restés dans l'étuve à 38 degrés pendant une semaine.

Dans les cellules épidermiques vivantes du bulbe entier, quand la température s'élève, un ensemble de réactions chimiques transforme par conséquent les produits de l'hydrolyse des lipides intravacuolaires en glucides, corps plus riches en oxygène que les lipides hydrolysés. En rapport avec cette oxydation nous pouvons vérifier que l'amidon n'apparaît plus dans les cellules épidermiques quand le bulbe est dans l'air confiné. Dans deux expériences successives nous avons enfermé les bulbes avec un godet rempli d'eau dans une boîte de verre fermée hermétiquement par un couvercle rodé. Dans les deux cas les bulbes ainsi placés dans l'étuve à 38 degrés étaient moisies au bout d'une semaine mais quelques écailles épargnées nous ont montré dans leur épiderme des concrétions intravacuolaires conservées ainsi que des figures myéliniques et des cordons pelotonnés, rarement des cristaux aciculaires groupés en aigrettes, jamais d'amidon.

Il ne saurait être question de relier directement lipides et glucides en quelques réactions chimiques. On doit donc penser que les cellules épidermiques du bulbe de *L. candidum* peuvent, en partant des mêmes éléments, édifier, suivant la température à laquelle se produit la végé-

tation, l'une ou l'autre catégorie de corps. C'est une explication analogue que donne SAVELLI [92] de la constitution partiellement lipidique de certains grains d'amidon : cet auteur pense, en effet, que les lipides résultent de la transformation des constituants normaux de l'amidon au cours de l'élaboration de ces grains. Dans le cas du bulbe entier nous voyons un ensemble de transformations chimiques relier de manière réversible lipides et glucides. Quand la température s'élève des glucides sont produits aux dépens des lipides intravacuolaires hydrolysés. Quand la température s'abaisse la transformation inverse se produit, aboutissant, comme nous allons le voir, à la réapparition de lipides concrétionnés dans les vacuoles des cellules épidermiques du bulbe (1).

Le séjour dans l'étuve à 38 degrés pendant une semaine ayant fait disparaître les concrétions lipidiques intravacuolaires et apparaître de l'amidon dans l'épiderme d'un bulbe, nous avons alors exposé ce bulbe au froid. Au bout de quelques jours, la température moyenne restant nettement au-dessous de zéro, nous avons observé que, dans la plupart des cellules épidermiques, il n'existait plus de grains d'amidon tandis qu'étaient réapparues les concrétions lipidiques intravacuolaires sous forme de masses sphéro-cristallines biréfringentes. Certaines cellules ayant conservé des grains d'amidon ne montraient pas encore de concrétions lipidiques intravacuolaires.

Dans les conditions normales de végétation, des stérides et phospholipides se trouvent donc concrétionnés dans les vacuoles des cellules épidermiques du bulbe de *Lilium candidum* sous l'effet du froid. Comme le signale EMBERGER, le bulbe de Lis blanc n'est en effet jamais à l'état de vie ralentie. Pendant la période de vie souterraine il végète encore très activement en plein hiver. Les écailles imbriquées du bulbe étant exposées au froid, surtout dans la région de leur pointe non recouverte par les autres écailles, c'est précisément là que les concrétions abondent alors qu'elles se raréfient graduellement vers la partie moyenne et la base des écailles. Quand l'abaissement de température est trop grand le tissu est gelé et l'on observe alors, dans les cellules épidermiques, la précipitation générale des lipides intravacuolaires, signalée par MIRANDE. Les figures obtenues dans cet épiderme gelé rappellent celles que nous avons décrites dans

(1) Cette transformation réversible des lipides en glucides a été constatée par TUTTLE chez une plante arctique, observée par lui dans les régions froides du Canada : *Linnaea borealis*. Cette plante est riche en lipides pendant l'hiver mais il suffit de la porter à la chaleur pour qu'en deux jours les corps gras se transforment en amidon ; si on la reporte au froid, en huit jours, l'amidon disparaît et les lipides s'accumulent à nouveau [9 : I p. 156 et II p. 191].

COSTER a, d'autre part, suivi la transformation de l'amidon en lipides dans les arbres pendant l'hiver mais il n'a pu réaliser expérimentalement cette transformation dans les branches placées pendant un mois à cinq degrés au-dessous de zéro [10].

les écailles en voie de dessiccation (Fig. I) et nous retrouvons ici l'identité des modifications de structure produites dans les cellules végétales par le gel, la plasmolyse et la fanaison [59].

Essayons, en terminant, de préciser le mécanisme des expériences que nous avons pu réaliser. Les concrétions intravacuolaires (stérionoplastes) se sont montrées extrêmement sensibles à l'élévation de température, fait en rapport avec leur constitution essentiellement phospholipidique (on sait que la lécithine est facilement altérée à l'air *in vitro* sous l'action de la chaleur). Nous avons pu suivre la désagrégation de ces corps et repérer le temps au bout duquel on l'obtient aux diverses températures. Cette désagrégation, phénomène physico-chimique certainement très complexe (dissolution, hydrolyse, oxydation) se trouve réalisée au sein de la solution colloïdale intravacuolaire, partie non vivante de la cellule; on l'obtient même dans les cellules mortes désorganisées. Nous restons donc ici très loin de l'oxydation respiratoire, phénomène essentiellement vital qui se trouve ralenti progressivement au-dessus de 40 degrés [54]. Nous avons, au contraire, vu nos résultats s'ordonner suivant la loi de VAN'T HOFF (accélération illimitée de la vitesse) et *tout se passe comme si* notre étude portait non pas sur les colloïdes intravacuolaires mais sur de la lécithine *in vitro*.

Quand la désagrégation des corps lipidiques intravacuolaires se trouve réalisée dans les cellules vivantes, nous établissons un rapport avec la formation de glucides. Nous pouvons constater cette intervention de la matière vivante (élaboration d'amidon) en opérant sur le bulbe entier.

FLEURS DE LIS

Pendant l'hiver et tout à fait au début du printemps, nous avons étudié les concrétions lipidiques intravacuolaires dans les fleurs de *Lilium candidum*, *L. longiflorum Harrisii* des fleuristes. Nous nous sommes alors proposés de suivre le développement de ces concrétions intravacuolaires, d'étudier leur apparition dans les fleurs très jeunes. Pour cette étude le Muséum mettait obligeamment à notre disposition les diverses espèces de Lis (fleurissant normalement en juillet-août) cultivées à l'École de Botanique. Or quel ne fut pas notre étonnement de ne retrouver dans les fleurs examinées ainsi en plein été aucune sorte de concrétions dans les vacuoles des cellules épidermiques du stigmate, du style, de l'ovaire ou du filet des étamines. Végétant normalement dans la terre du jardin les divers Lis ne présenteraient donc plus de corps concrétionnés dans les cellules épidermiques du gynécée et de l'androcée. Nous avons constaté cette absence complète de concrétions intravacuolaires dans les fleurs des

espèces suivantes : *L. candidum*, *L. Wilmottiae*, *L. pyrenaicum*, *L. Mar-
tagon*, *L. regale*, *L. Henryi*.

Pour suivre cette modification cytochimique les fleurs de *L. longi-
florum Harrisii* sont particulièrement intéressantes. Les horticulteurs
obtiennent en effet la floraison de cette espèce à peu près à n'importe
quel moment de l'année. Or, dans toutes les fleurs que nous avons
pu étudier en juin-juillet nous n'avons jamais retrouvé les corps
décrits précédemment. Il en reste parfois cependant quelques vestiges
sous forme de corps granuleux à peine visibles ou de masses sphéro-
cristallines assez rares.

C'est donc seulement lorsque la floraison des Lis est obtenue, en
plein hiver ou dès le début du printemps que l'on retrouve jusque
dans les pièces du gynécée et de l'androcée les concrétions lipidiques
intravacuolaires que nous avons précédemment étudiées, en fonction
de la température, dans les bulbes. La présence constante de ces corps
dans les fleurs provenant d'un forçage résulte donc des conditions
particulières de la végétation pendant l'hiver dans les serres : lumière
réduite, température moins élevée mais constante, état hygromé-
trique plus élevé que pendant les mois d'été.

Voyons maintenant si les faits nouveaux, apportés tout récemment
par la publication posthume des dernières notes de MIRANDE, con-
firment sur ce point nos observations. Après l'avoir publié, M. GUIL-
LIERMOND a bien voulu nous permettre d'étudier le manuscrit de
MIRANDE; nous en avons tout de suite remarqué l'admirable précision
qui devient pour nous ici une qualité essentielle. En effet, d'après
les dates qui marquent chacune des observations effectuées par ce
savant, nous allons pouvoir rapprocher l'existence des concrétions
stériniques des conditions dans lesquelles s'est effectuée la floraison
des espèces étudiées.

Dans les sépales et les pétales de *L. candidum* c'est toujours au
début du mois de juin et dans les fleurs encore en bouton, mesurant
au plus cinq centimètres de hauteur, que MIRANDE constate la présence
des concrétions stériniques. Pendant trois années consécutives (1926-
27-28) il reprend sur ce point son travail et se trouve brusquement
arrêté dans l'étude générale portant sur les fleurs épanouies en pleine
saison : « dans cette observation I sur un sépale, face inférieure, je
n'ai observé aucun dépôt de stérine... ». La présence de stérine dans
les étamines est signalée en janvier dans les fleurs de Lis blanc (peut-
être s'agit-il, étant donné l'époque, du *L. Harrisii* et non pas de *L. can-
didum*). D'autre part c'est bien en juin que MIRANDE étudie la stérine
florale du *L. tigrinum*; cependant la floraison ayant plutôt lieu pour
cette espèce en juillet nous pensons qu'il est encore question ici de
fleurs venues avant la saison. Quant aux fleurs de *L. excelsum* elles
furent achetées sur le marché de Grenoble et MIRANDE ne retrouve pas
dans ces Lis isabelle, espèce dont cependant la culture se rapproche le

plus de celle du Lis blanc commun [106], des concrétions aussi abondantes que dans les fleurs en boutons de *L. candidum* étudiées précédemment. L'étamine de *L. croceum umbellatum* ne présente que des amas de stérine très petits, agités de mouvements browniens. Dans les fleurs de *L. superbum* MIRANDE ne retrouve plus aucune concrétion stérinique et cependant il étudie soigneusement le chondriome des cellules épidermiques. Enfin dans un autre Lis, reçu de Hollande et cultivé dans son jardin, *L. Thunbergianum alutaceum*, MIRANDE trouve seulement dans les sépales « dans quelques cellules des gouttes assez grosses entourées souvent d'un nuage de granulations semblant cristallines. »

Les concrétions stériniques, étudiées par MIRANDE, paraissent donc caractériser exclusivement les fleurs obtenues avant la saison. Comme nous, en plein été, MIRANDE ne retrouve plus les corps lipidiques concrétionnés dans l'épiderme des pièces florales.

FEUILLES D'IRIS

C'est pendant l'hiver que GUILLIERMOND a étudié les corps globuleux intravacuolaires dans l'épiderme des feuilles d'*Iris*. Au début du printemps, il voit ces corps se dissoudre peu à peu dans les cellules épidermiques [33]. Nous avons poursuivi cette étude, à partir du mois de juin, pendant tout l'été et nous avons pu constater ainsi que les corps globuleux intravacuolaires deviennent très rares en août-septembre. On ne les trouve que tout à fait à la base des feuilles, en très petit nombre et sur la face interne seulement. Même dans les deux espèces *simile* et *speciosa* de l'Iris des jardins, au mois d'octobre, l'épiderme des feuilles ne présente des corps globuleux que sur la face interne et sur un centimètre de hauteur environ à partir du point d'insertion sur le rhizome.

En décembre, au contraire, nous avons constaté la présence de corps globuleux très volumineux sur une grande étendue de l'épiderme foliaire. L'action du froid paraît s'exercer surtout sur la face externe des feuilles. Cette surface prend une teinte rouge due à la formation de pigment anthocyannique. On peut alors constater la présence des corps globuleux intravacuolaires intensément colorés par l'anthocyane dans l'épiderme des feuilles sur toute la moitié inférieure de leur hauteur, comme l'a signalé GUILLIERMOND.

En plaçant sous lamelle, dans une boîte de Petri et dans l'étuve, un lambeau d'épiderme contenant ces corps lipidiques intravacuolaires, les modifications obtenues sont beaucoup plus rapides que dans le cas du bulbe de Lis. Ainsi à 45 degrés il suffit de cinq heures de séjour des préparations dans l'étuve pour que les concrétions lipidiques aient

complètement disparu. De plus, contrairement à ce qui se produit dans l'épiderme du bulbe de *Lis*, il n'en reste aucun vestige.

Cette grande sensibilité des concrétions lipidiques intravacuolaires à l'action de la chaleur rappelle les résultats obtenus pour l'ensemble du vacuome par FAMIN [21]. Cet auteur a remarqué l'extrême variabilité de forme que présentent les vacuoles des cellules épidermiques dans les feuilles d'*Iris* sous l'effet de l'élévation progressive de la température. « Jamais, dit-il, nous n'avons tant eu l'impression de l'extrême instabilité physique et chimique du protoplasme de la cellule vivante ainsi que de sa très grande complexité ». De plus, ces expériences, réalisées sur platine chauffante, permettent de penser qu'à 37 degrés les cellules épidermiques ne sont pas lésées mais qu'il n'en va plus de même à 47 degrés (1). FAMIN est amené à conclure que ce sont les graisses et les lipoïdes de la cellule que la température met en mouvement, ces corps paraissant jouer un rôle important dans les variations observées.

Pour étudier (pendant l'hiver) les effets produits par l'élévation de la température sur les concrétions lipidiques intravacuolaires dans les cellules épidermiques restées vivantes, nous plaçons, dans l'étuve, non plus des lambeaux d'épiderme mais des feuilles entières. Pour obtenir des résultats applicables aux conditions normales de végétation avec une élévation peu considérable de la température nous préférons même opérer sur des tronçons de rhizome portant des bouquets de feuilles. C'est ainsi que nous avons pu suivre pendant plusieurs jours à la température moyenne de 40 degrés, par coloration vitale du tissu épidermique prélevé à la base des feuilles, les modifications très variables du vacuome, progressivement contracté. Nous voyons dans un nombre croissant de cellules les concrétions lipidiques intravacuolaires se fondre dans l'ensemble du vacuome. Celui-ci apparaît de plus en plus consistant, de sorte qu'il se produirait dans toutes ces expériences non pas une dilution des concrétions dans le suc vacuolaire mais une condensation de ce dernier l'amenant à la concentration des concrétions intravacuolaires préexistantes.

D'ailleurs, quand nous opérons (en hiver également) de façon analogue sur des pieds d'*Iris germanica*, variété *simile*, les corps globuleux intravacuolaires, plus gros et plus nombreux, ne disparaissent même pas. Plaçons chacun des fragments de rhizome portant un bouquet de feuilles dans le goulot d'un bocal de telle sorte qu'il trempe constamment en partie dans l'eau, celle-ci étant renouvelée au fur et à mesure de son évaporation. Effectuons dans ces conditions et comparativement des cultures à la température du laboratoire et

(1) Nous avons constaté sur les écailles bulbaires de *Lilium candidum* placées dans l'étuve que la mort des cellules épidermiques ne se produit qu'au-dessus de 45 degrés.

dans l'étuve à 38 degrés. Le premier effet de l'élévation de la température est la dessiccation accélérée des feuilles les plus extérieures, ces feuilles jaunissant à partir de leur sommet (elles sont déjà normalement un peu desséchées pendant l'hiver). En même temps, nous constatons régulièrement l'apparition de racines, atteignant une longueur moyenne de deux centimètres en cinq jours, sur les rhizomes placés dans l'étuve à 38 degrés tandis qu'à la température ordinaire aucune racine n'est encore visible. Nous plaçons dans l'étuve, en même temps que ces rhizomes d'*Iris*, des bulbes de *Lilium candidum*. Dans ces bulbes, au bout d'une semaine, la température restant fixée à 38 degrés, les concrétions lipidiques intravacuolaires des cellules épidermiques ont complètement disparu tandis qu'apparaissaient de nombreux grains d'amidon. Prélevons alors l'épiderme à la base des feuilles d'*Iris* : nous constatons, au contraire, la présence des corps globuleux intacts dans les vacuoles. Cette résistance remarquable à l'élévation de température est peut-être due à la richesse particulière en stériles de ces corps. Rappelons ici que dans les bulbes de Lis blanc originaires du Maroc subsistent, seuls, les calculs de phytostérol.

STÉRIDES ET PHOSPHOLIPIDES EN PSEUDO-SOLUTION DANS LES VACUOLES

Les concrétions lipidiques intravacuolaires, que nous venons d'étudier, résultent de la précipitation des stérides et des phospholipides, se trouvant en solution colloïdale dans le vacuome. Essayons de trouver, maintenant, une méthode permettant de caractériser la présence de ces lipides dans le suc vacuolaire non condensé et, particulièrement, dans les jeunes vacuoles ne contenant pas encore de concrétions.

Dans les plus jeunes écailles, prélevées tout à fait au centre du bulbe de *Lilium candidum*, les cellules épidermiques présentent, comme nous l'avons vu, de petites vacuoles dont le contenu paraît homogène (1, Pl. I). Détachons un lambeau de cet épiderme pour le placer entre lame et lamelle dans une boîte de Petri avec un godet d'eau. Portons le tout dans l'étuve pendant une demi-heure à 55 degrés. Dans le vacuome en voie de désagrégation apparaissent des figures myéliniques puis, finalement, se constituent des amas de cordons pelotonnés, donnant des figures plus réduites mais exactement comparables à celles que nous avons précédemment obtenues dans les cellules plus développées (Fig. III). Le vacuome de ces petites cellules épidermiques renfermerait donc déjà en solution colloïdale condensée les phospholipides dont nous avons constaté la précipitation dans les écailles desséchées (Fig. I).

Mais il n'apparaît ainsi des figures myéliniques dans le vacuome désagrégé sous l'action de la chaleur que dans le cas d'une solution colloïdale particulièrement riche en phospholipides comme dans l'épiderme des écailles bulbaires de Lis. Généralement, sous l'effet d'une telle élévation de température, les jeunes vacuoles sont rapidement et complètement désorganisées.

D'autre part, les racines de Blé ou d'Orge étant écrasées sous lamelle dans une goutte de Soudan III (en solution dans l'alcool ou dans l'hydrate de chloral), nous constatons toujours une désorganisation immédiate et complète du système vacuolaire dans les cellules du méristème. Nous avons essayé de diminuer l'action destructrice que l'alcool ou l'hydrate de chloral exercent sur le vacuome de ces cellules en étendant, au préalable, d'une quantité suffisante d'eau, les solutions colorantes employées. Mais les jeunes vacuoles que nous étudions ici restent très sensibles à l'action de l'alcool ou de l'hydrate de chloral dilués tandis que la coloration demanderait un temps considérable pour devenir assez nette. Nous avons d'ailleurs, mais en vain,

maintenu pendant plusieurs semaines des plantules de Blé sur de telles solutions colorantes extrêmement diluées.

RÉSULTATS OBTENUS SUR DES TISSUS PRÉALABLEMENT FIXÉS DANS LE BICHROMATE DE POTASSIUM

Nous avons constaté, notamment dans l'épiderme des feuilles d'*Iris*, que les corps lipidiques intravacuolaires présentent, après fixation pendant 48 heures dans le bichromate de potassium, une teinte jaune parfois assez intense, en rapport avec la présence des composés oxyflavoniques. Aussi n'est-il pas toujours possible de distinguer la coloration ainsi obtenue de celle qui résulte, ensuite, de l'emploi du rouge Soudan III. Mais nous pouvons, par contre, dans tous les cas, sans aucune confusion possible, observer la couleur noir foncé que le noir Soudan B ou l'hématoxyline acétique confèrent aux corps lipidiques préalablement teints en jaune par la fixation dans le bichromate. Aussi chercherons-nous maintenant à réaliser ces dernières colorations sur le contenu même des jeunes vacuoles.

Bulbe de Lis.

Prélevons des lambeaux d'épiderme sur les plus petites écailles centrales du bulbe de *Lilium candidum* et plaçons-les dans une solution de bichromate de potassium à 3 p. 100 pendant 48 heures. Ainsi fixées, les cellules épidermiques conservent leur structure normale mais il se produit une condensation du contenu vacuolaire primitivement homogène. Dans l'axe des jeunes vacuoles, nous trouvons, en effet, une masse concrétionnée, teinte en jaune, la coloration étant d'ailleurs bien moins accentuée que dans l'*Iris*. Nous montrerons plus loin la présence de composés oxyflavoniques dans les vacuoles de ces cellules épidermiques, particulièrement dans les écailles en voie de dessiccation.

Après les avoir soigneusement lavés, traitons ces fragments de tissu épidermique par le noir Soudan B en solution dans de l'alcool à 70 degrés. La coloration n'étant réalisée qu'au bout de 24 heures il faut, pour éviter l'évaporation de la solution alcoolique du colorant, opérer dans un tube bouché. Dans ces conditions, les masses concrétionnées dans les jeunes vacuoles des cellules épidermiques apparaissent colorées en noir foncé (Fig. IX, 1).

Après fixation dans le bichromate de potassium et lavage prolongé, traitons, d'autre part, les lambeaux d'épiderme par l'hématoxyline acétique de Kultchitzky pendant 24 heures et différencions ensuite

avec le mélange de Weigert. Les masses concrétionnées au centre des vacuoles se trouvent colorées en noir intense, exactement comme avec le noir Soudan B (Fig. IX, 1). Le bichromate de potassium a donc insolubilisé, en les précipitant, les phospholipides qui se trouvaient en solution colloïdale dans les jeunes vacuoles d'aspect homogène.

Feuilles d'Iris.

En étudiant les feuilles d'*Iris germanica*, GUILLIERMOND a pu constater la présence des corps globuleux intravacuolaires dans les cellules épidermiques très jeunes. La fixation, pendant 48 heures, dans le bichromate de potassium à 3 p. 100, produit une coloration jaune de ces concrétions et détermine, de plus, la précipitation d'autres corps granuleux intravacuolaires, également colorés en jaune. Tous ces corps se trouvent réunis au centre des vacuoles et constituent un réseau de cordons noueux emmêlés.

Après lavage prolongé, nous plaçons les lambeaux d'épiderme, préalablement fixés par le bichromate, dans le noir Soudan B en solution alcoolique à 70 degrés. Au bout de 24 heures, dans les cellules épidermiques, le réseau intravacuolaire apparaît intensément coloré en noir (Fig. IX, 2). Nous obtenons le même résultat après 24 heures de séjour dans l'hématoxyline acétique et différenciation dans le mélange de Weigert.

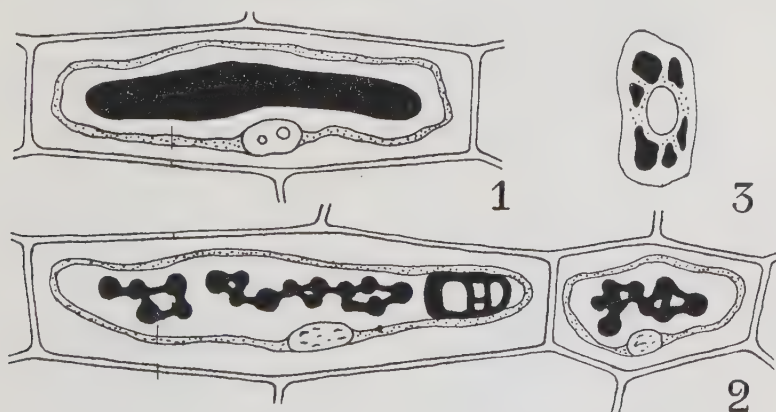


FIG. IX. — Après fixation dans le bichromate de potassium :

1. coloration par le noir Soudan B ou suivant la méthode de Dietrich dans l'épiderme des jeunes écailles du bulbe de *L. candidum*;
2. même coloration dans l'épiderme des jeunes feuilles d'*Iris germanica*;
3. coloration par le noir Soudan B des vacuoles dans le méristème de la racine d'Orge.

Le contenu des jeunes vacuoles, précipité par le bichromate de potassium, paraît donc être encore essentiellement constitué par des

lipides. Rappelons ici que GICKLHORN établit un rapprochement entre les formes ramifiées et spongieuses que présentent parfois les corps globuleux intravacuolaires de l'*Iris* et l'aspect de l'appareil de Golgi mis en évidence par les méthodes argentiques [26]. Nos préparations représentant l'ensemble du vacuome concrétionné et fortement teint en noir, ce rapprochement est grandement facilité.

Nous obtenons, d'autre part, les mêmes colorations des lipides intravacuolaires en étudiant les coupes effectuées, après inclusion dans la paraffine, sur des fragments de jeunes feuilles d'*Iris* ayant séjourné pendant 48 heures au moins dans le bichromate de potassium à 3 p. 100. Sous l'action de ce fixateur, le vacuome des cellules épidermiques se trouve concrétionné, comme il a été dit ci-dessus, mais, de plus, dans ces coupes, nous constatons que dans le mésophylle aucune précipitation analogue ne se produit; les corps concrétionnés dans l'épiderme présentent une coloration jaune extrêmement claire, aussi pouvons-nous obtenir nettement, avec le Soudan III, la coloration rouge orangé, caractéristique des lipides.

Enfin, nous avons effectué, sur les corps étudiés dans ces coupes, les réactions du biuret, de Raspail, de Turchini et Derrien. Aucune coloration n'ayant ainsi été obtenue nous concluons, avec GUILLIERMOND, que ces corps, concrétionnés dans les vacuoles des cellules épidermiques, ne paraissent pas renfermer de protides (comme l'a montré GUILLIERMOND la présence de composés phénoliques explique les résultats positifs que donnent les réactions xanthoprotéique et de Millon). Pourtant, dans ces coupes, par suite de la fixation dans le bichromate de potassium, la plupart des concrétions intravacuolaires ne se dissolvent plus dans la potasse ou l'acide acétique entrant dans la composition des réactifs du biuret et de Turchini. L'absence de coloration ne peut donc être expliquée par l'action dissolvante du réactif et prouve bien, par conséquent, l'absence des protides. Ainsi, par exemple, la méthode préconisée par Derrien et Turchini permet de constater une coloration gris bleu localisée sur le noyau et le cytoplasme tandis que les masses concrétionnées dans les vacuoles conservent la teinte jaune clair, due à la fixation dans le bichromate de potassium, sans jamais présenter la teinte noire que prendraient, dans les mêmes conditions, les substances protidiques.

Racines de Blé, Orge, Lis, Ricin, Courge, Haricot et Pois.

Les grains de Blé ou d'Orge ayant commencé à germer, prélevons les pointes des racines pour les placer dans le bichromate de potassium à 3 p. 100 pendant 48 heures. Lavons ensuite soigneusement ces pointes et plaçons-les enfin pendant 24 heures dans du noir Soudan B en solution dans de l'alcool à 70 degrés. Malgré le durcissement iné-

vitale qui se produit dans ces conditions, nous pouvons écraser ces pointes de racines entre lame et lamelle en les dissociant le plus possible. C'est ainsi que nous avons pu observer la coloration par le noir Soudan des petites vacuoles dans les cellules du méristème (Fig. IX, 3).

Après fixation, également pendant 48 heures, dans le bichromate de potassium à 3 p. 100, nous effectuons des coupes après inclusion dans la paraffine mais le vacuome apparaît dans ces conditions très mal conservé, la structure des jeunes cellules méristématiques se trouvant bouleversée. Si nous opérons par contre la fixation suivant la méthode de Regaud les vacuoles apparaissent sous forme de canalicules ou de cavités incolores. De plus, comme l'ont montré les travaux de GUILLIERMOND, le contenu de ces vacuoles est assez souvent en partie conservé sous forme de précipités intravacuolaires incolores tandis qu'il est généralement dissous en totalité par les autres fixateurs.

Le mélange de Regaud apparaît donc ici très précieux : il fixe assez fidèlement la structure cellulaire et l'action dissolvante que le formol exercerait sur les substances lipidiques est diminuée par la présence du bichromate de potassium. D'ailleurs, nous avons constaté que l'on peut diminuer la proportion de formol entrant dans la compo-

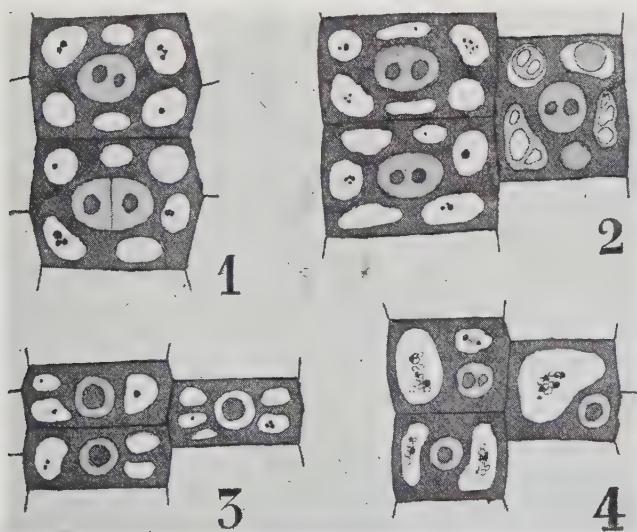


FIG. X. — Après fixation par la méthode de Regaud :

1. Coloration par le noir Soudan B des précipités intravacuolaires dans la racine de Lis.
2. Même coloration dans la racine de Ricin, les vacuoles tannifères restant colorées en jaune.
3. Même coloration dans la racine d'Orge.
4. Même coloration dans la racine de Pois, réalisée seulement sur une petite partie des précipités intravacuolaires.

sition de ce fixateur sans que la netteté des figures obtenues soit diminuée. Nous employons le mélange suivant :

Formol neutre à 40 p. 100.	5 cc.
Bichromate de potassium à 3 p. 100.	45 cc.

Les objets restent immergés pendant quatre jours dans ce fixateur non renouvelé. Après lavage dans l'eau courante, nous effectuons en un temps minimum l'inclusion dans la paraffine, les objets ne séjournant pas pendant plus de trois heures au total dans les divers bains utilisés (alcool, toluène, paraffine).

En opérant suivant cette technique nous avons d'abord étudié les racines très jeunes de Blé et d'Orge : dès le début de la germination nous prélevons sur chaque graine la coléorhize. Les jeunes racines restant enfermées dans cette sorte d'étui, l'inclusion dans la paraffine se trouve facilitée; de plus chacune des coupes pratiquées dans la coléorhize sectionne le plus souvent deux ou trois radicules. Dans les cellules du méristème les vacuoles renferment assez souvent des granulations incolores; si nous passons les coupes pendant quelques minutes dans une solution de noir Soudan B dans de l'alcool à 70 degrés les mêmes granulations intravacuolaires apparaissent colorées en noir foncé (Fig. X, 3).

Nous obtenons la même coloration par le noir Soudan B des précipités intravacuolaires dans les racines de Lis (Fig. X, 1; ces racines apparaissent sur les écailles bulbaires ou sur les bulbes entiers conservés à l'obscurité) ainsi que dans les racines de Courge et de Ricin (Fig. X, 2). Dans ces dernières, les vacuoles riches en tanin conservent une couleur jaune intense (conférée par le bichromate de potassium) tandis que les autres vacuoles, contenant probablement des lipides, présentent des précipités colorés intensément par le noir Soudan B. Dans les racines de Haricot et de Pois, les précipités intravacuolaires sont très volumineux mais à peine quelques granulations se trouvent colorées en noir foncé par le Soudan B (Fig. X, 4). Les lipides intravacuolaires se trouveraient, dans ces dernières racines, associés à des substances insolubles dans l'alcool, probablement en grande partie protidiques.

COLORATION DES JEUNES VACUOLES

PAR LE BLEU D'INDOPHÉNOL

Nous avons vu que le bleu d'indophénol naissant colore directement les concrétions lipidiques intravacuolaires dans le bulbe de Lis. Par contre, les corps analogues, étudiés dans les feuilles d'*Iris*, étant extrêmement solubles dans les alcalis, se trouvent toujours rapidement dissous, sans présenter la moindre coloration, dans le mélange nadi contenant une proportion normale de potasse. Mais en

réduisant cette proportion de moitié nous avons obtenu la coloration des corps globuleux intravacuolaires dans l'épiderme des feuilles d'*Iris*, la dissolution de ces corps étant suffisamment ralentie.

Pour essayer d'obtenir maintenant une coloration d'ensemble du vacuome, aux stades les plus jeunes, nous irons ici beaucoup plus loin et la quantité de potasse se trouvera réduite au dixième de sa valeur normale. Pour cela composons la solution A suivant la formule :

Potasse caustique.....	= 0,02 g.
Naphtol α	= 0,50 g.
Eau.....	= 100 cc.

Nous obtenons la dissolution du naphtol en chauffant le mélange, pendant plusieurs heures, sur la flamme très réduite d'un bec Bunsen. La solution B reste composée suivant les proportions normalement employées, soit ici 0,50 g. de chlorhydrate de diméthyl-paraphénylène-diamine dans 100 cc. d'eau. Nous prenons 3 cc. de chacune des deux solutions et nous ajoutons 20 cc. d'eau pour obtenir la solution colorante. Cette solution ne renferme plus que 0,0023 g. p. 100, soit sensiblement $\frac{2}{100.000}$ ^e de potasse.

Bulbe de Lis.

Dans ce colorant contenant un minimum de potasse, plaçons des lambeaux d'épiderme, prélevés sur de petites écailles du bulbe de *Lilium candidum*. Au bout de quelques minutes, les vacuoles de ces jeunes cellules épidermiques, ne contenant pas encore de concrétions lipidiques, apparaissent uniformément colorées en bleu clair. Dans ces vacuoles, colorées aussi nettement qu'elles pourraient l'être par un colorant vital comme le bleu brillant de crésyl ou le rouge neutre, nous trouvons souvent des figures myéliniques, sous forme de cordons qui s'enroulent en constituant des anneaux et des pelotons (Pl. II, 1).

Les plus petites cellules épidermiques, observées sur les écailles tout à fait centrales du bulbe, donnent les résultats les plus probants. Le vacuome étant alors constitué par une solution colloïdale condensée précipite abondamment sous forme de figures myéliniques, probablement sous l'action de la potasse entrant encore en excès dans la composition du réactif (Pl. II, 2). Nous distinguons ainsi des granules et des anneaux, colorés en bleu très foncé et agités de mouvements browniens, dans les jeunes vacuoles qui présentent une teinte générale moins intense. Nous obtenons, de la sorte, des figures comparables à celles que nous avons observées par coloration vitale (1, Pl. I).

Le bleu d'indophénol se comporte donc ici comme un colorant vital : le cytoplasme et le noyau restant incolores, la teinte bleue prise

par le vacuome est d'autant plus intense que la cellule est plus jeune. Cependant le bleu d'indophénol colore en même temps en violet le globule oléagineux intracytoplasmique (Pl. II, 1, G).

Racine de Lis.

Les écailles, détachées d'un bulbe de Lis, peuvent être conservées pendant plusieurs mois sans que leurs cellules épidermiques cessent d'être colorables vitalement. On observe même, autour de leur base cicatrisée, l'apparition de caïeux pourvus dans certains cas de racines, formées et végétant à l'air libre, indépendamment de toute humidité.

Nous avons placé les écailles, présentant ainsi de petites racines, en culture sur des solutions extrêmement étendues de bleu d'indo-

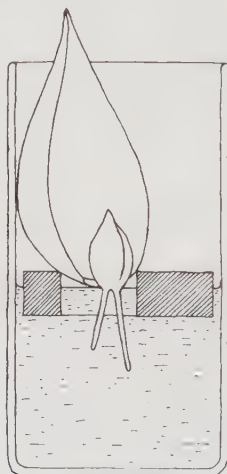


FIG. XI. — Dispositif permettant d'obtenir la coloration des racines de Lis dans le bleu d'indophénol extrêmement étendu : couronne de liège maintenant l'écaille bulbaire à la surface de liquide.

phénol (Fig. XI). La proportion de potasse entrant dans la composition du nadi n'est plus ici réduite mais, avant de les mélanger à volumes égaux, nous étendons les solutions A et B de cent fois leur volume d'eau de source. Au bout de quelques heures, dans la liqueur obtenue, par suite de la libération ralentie du bleu d'indophénol, apparaît une teinte bleu violet clair qui persiste pendant plusieurs jours. D'après la formule on peut calculer la proportion du colorant obtenu avec les deux solutions étendues utilisées. Nous trouvons ainsi sensiblement pour 100 cc. du mélange : 0,001 g. soit $\frac{1}{100.000}$ e de bleu d'indophénol.

Les racines de *Lis* plongeant dans un volume assez considérable de cette solution extrêmement diluée de bleu d'indophénol, au bout de 24 heures, nous prélevons leurs pointes pour les écraser entre lame et lamelle (appuyer sur la lamelle assez fortement une deuxième lame). Nous constatons alors que le bleu d'indophénol a pénétré dans les cellules de la coiffe et dans celles du méristème, colorant en bleu le système vacuolaire (Pl. II, 3).

La coloration ainsi obtenue dans les cellules situées à la pointe des racines peut être expliquée par la présence de lipides intravacuolaires, correspondant à ceux dont la présence a été précédemment constatée dans l'épiderme du bulbe. Nous pouvons d'ailleurs immerger des lambeaux de cet épiderme dans la solution de bleu d'indophénol très étendu servant ici pour les cultures et constater, au bout de 24 heures, une coloration bleu intense des concrétions intravacuolaires (forme stérinoplaste) dans le tissu épidermique.

Feuille et racine d'*Iris*.

Pour étudier les jeunes feuilles de l'*Iris* des jardins, variété *simile*, nous employons, comme pour les écailles bulbaires de *Lis*, du nadi contenant dix fois moins de potasse. Avec une aiguille lancéolée détachons des lambeaux d'épiderme sur les feuilles les plus petites. Après immersion pendant une dizaine de minutes dans le nadi, nous obtenons, dans les jeunes vacuoles, la précipitation de nombreux granules colorés en bleu foncé.

Nous avons, d'autre part, obtenu la formation de racines sur un fragment de rhizome d'*Iris* pourvu de feuilles en le faisant tremper dans l'eau pendant plusieurs mois. Ce résultat nous a permis d'étudier sur les jeunes racines d'*Iris*, en opérant comme pour les racines de *Lis*, l'action prolongée du nadi étendu de cent fois son volume d'eau de source. Nous constatons, en écrasant l'extrémité de ces racines entre lame et lamelle, que le bleu d'indophénol pénètre en un jour ou deux dans les vacuoles des cellules de la coiffe et du méristème, déterminant la formation de précipités intravacuolaires.

Nous distinguons, dans ces vacuoles teintes en bleu violet clair, des granulations colorées en bleu foncé, groupées en amas à peu près immobiles, et d'autres corps granuleux isolés, colorés en bleu clair et agités de mouvements browniens (Pl. II, 4).

Racine de *Jacinthe*.

Étudions les petites racines, dès le début de leur formation, sur le bulbe de *Hyacinthus orientalis* placé sur carafe. Nous employons toujours le mélange nadi dilué dans cent fois son volume d'eau de

source. Les racines de Jacinthe trempant dans cette solution, nous observons au bout de 24 heures une coloration bleu clair des vacuoles dans presque toutes les cellules de la coiffe et du méristème et la précipitation de granulations intravacuolaires colorées en bleu foncé (Pl. II, 5).

Dans un certain nombre de cellules du méristème nous retrouvons, colorés en bleu foncé, les corps granuleux dont GUILLIERMOND [37] a pu préciser la nature lipidique (coloration directement réalisable avec le Soudan alcoolique). Deux jours après, la solution de bleu d'indophénol apparaît complètement décolorée et, dans les racines également, le vacuome ne présente plus aucune coloration. On peut à ce moment-là, cependant, avec le rouge neutre, obtenir une coloration vitale des cellules qui se trouvaient précédemment colorées par le bleu d'indophénol.

Racines de Haricot et de Pois.

La graine de Haricot (*Phaseolus vulgaris*) germant sur du papier humide, la racine principale avorte généralement et des radicelles apparaissent en grand nombre, groupées en faisceaux. Un bouchon de liège percé de trous nous permet de maintenir ces graines à la surface d'une solution à 1 p. 100 de nadi. Les radicelles plongeant dans cette solution pendant plusieurs jours, nous observons, en écrasant leur pointe entre lame et lamelle, une coloration bleu très clair des vacuoles. Il s'est produit également une contraction du vacuome en même temps que la précipitation de granules intravacuolaires colorés en bleu foncé (Pl. II, 8). On obtient le même résultat en opérant avec la graine de Pois (*Pisum sativum*).

Racine de Ricin.

Après un début de germination normalement effectuée, nous transportons également les graines de Ricin (*Ricinus communis*) sur du nadi à 1 p. 100 dans l'eau de source. Au bout de 24 heures, prélevons quelques radicelles pour les écraser entre lame et lamelle. Les cellules de la coiffe et du méristème montrent leurs vacuoles colorées en bleu violet clair. De plus, la pénétration du bleu d'indophénol provoque également ici la formation de précipités intravacuolaires constitués par des granules et des bâtonnets agités de mouvements browniens et colorés en bleu foncé (Pl. II, 10, l). Dans un certain nombre de cellules, disposées en files longitudinales, nous distinguons le tanin formant des masses bulleuses colorées en bleu vert clair (Pl. II, 10, l). Au bout de 48 heures, nous obtenons des résultats encore plus nets, la culture des plantules de Ricin étant prolongée sur la même solution

colorante. Les vacuoles contenant du tanin prennent en effet une teinte bleue extrêmement foncée tandis que les autres vacuoles (probablement de nature lipidique) ne présentent plus qu'une coloration violet-rose très claire. Les préparations ainsi obtenues avec le bleu d'indophénol extrêmement étendu rappellent celles que GUILLIERMOND obtient par la méthode d'imprégnation osmique de Kolatchev [37].

Racines de Melon et de Courge.

La graine de Melon (*Cucumis Melo*) germant sur du papier humide, nous obtenons une fine racine principale bien développée. Les graines se trouvant ensuite placées pendant plusieurs jours sur du nadi étendu de cent fois son volume d'eau de source, les racines continuent leur développement et atteignent facilement une longueur de trois ou quatre centimètres. Nous sectionnons alors les pointes de ces racines pour les écraser entre lame et lamelle. Les vacuoles des cellules de la coiffe et du méristème nous apparaissent colorées en bleu violet clair et renferment des granulations teintées en bleu foncé (Pl. II, 9).

En opérant dans les mêmes conditions avec la graine de Courge (*Cucurbita maxima*) nous obtenons également une coloration bleu clair des jeunes vacuoles dans les cellules du méristème et la précipitation de corps granuleux intravacuolaires colorés en bleu foncé. Dans les cellules de plus grande taille, nous trouvons des corps globuleux d'aspect cristallin et des amas de fines granulations agitées de mouvements browniens.

Racines de Blé et d'Orge (hordénine).

Dès que les radicules atteignent 1 cm. de longueur transportons sur un volume assez considérable du mélange nadi (étendu de cent fois son volume d'eau de source) les grains de Blé (*Triticum sativum*) ou d'Orge (*Hordeum vulgare*) ayant commencé à germer dans l'eau. Dans ces conditions, les plantules poursuivent leur développement normal et les racines atteignent facilement, en quelques jours, plusieurs cm. de longueur.

Les grains de Blé ou d'Orge poursuivant ainsi leur germination en présence de bleu d'indophénol extrêmement dilué, prélevons au bout de 24 heures les pointes des racines pour les écraser entre lame et lamelle dans une goutte d'eau. Les cellules de la coiffe nous montrent alors des vacuoles colorées en bleu clair avec des corps granuleux de couleur plus intense (1). Dans les cellules du méristème, les petites

(1) Ces corps granuleux intravacuolaires existent normalement dans les cellules de la coiffe comme l'a montré GUILLIERMOND [37] en caractérisant leur nature lipidique (coloration directement réalisable avec le nadi ordinaire et avec le Soudan alcoolique).

vacuoles ont subi un gonflement en prenant régulièrement un contour arrondi : elles apparaissent colorées en bleu clair et plus ou moins remplies de granulations teintées en bleu foncé (Pl. II, 6). Enfin, même dans les cellules les plus grandes de ces extrémités de racines, nous observons une teinte de plus en plus claire des vacuoles dans lesquelles précipitent en nombre variable de volumineux corps sphériques intensément colorés (précipitation des stériles et phospholipides intravacuolaires).

Si, pour étendre le mélange nadi, nous prenons, non pas de l'eau de source, mais une solution aqueuse de lécithine, nous obtenons la même coloration bleu clair des vacuoles mais les corps granuleux intravacuolaires, colorés en bleu foncé, sont beaucoup plus nombreux et plus gros dans les cellules de la coiffe et du méristème (Pl. II, 7). L'absorption de la lécithine explique, comme nous le verrons, l'importance de ces concrétions intravacuolaires mais retenons ici que la lécithine absorbée vient simplement grossir et multiplier les granulations lipidiques qui se trouvaient déjà précipitées sous l'action du bleu d'indophénol.

Dans les cellules vivantes de ces extrémités de racines, le bleu d'indophénol caractérise la nature lipidique du vacuome dans lequel nous le voyons se dissoudre électivement. La coloration des vacuoles, ainsi obtenue, peut être comparée à celle que donnent les colorants vitaux. En cultivant des plantules de Blé et d'Orge sur des solutions étendues de rouge neutre, GUILLIERMOND et OBATON obtiennent une coloration vitale limitée aux cellules de la coiffe, du méristème et à quelques cellules différenciées situées un peu au-dessus [41]. La coloration vitale que nous donne ici le bleu d'indophénol présente la même localisation mais les vacuoles (normalement filamenteuses, mitochondriiformes) des cellules méristématiques sont gonflées, arrondies. La coloration par le bleu d'indophénol étant réalisée, ajoutons sous lamelle une goutte d'eau contenant du rouge neutre en dissolution. Nous voyons alors ce dernier colorant vital teindre progressivement les vacuoles; les précipités intravacuolaires précédemment teints en bleu prennent dans ces conditions une teinte violette de plus en plus foncée tandis que le cytoplasme et le noyau restent incolores.

Dans les cellules du méristème de la racine de Blé les méthodes argentiques (da Fano) ou mieux osmiques (Kolatchev) ont permis à GUILLIERMOND [37] d'obtenir dans les vacuoles la précipitation de corps intensément colorés. Les figures ainsi obtenues sont à peu près semblables à celles que nous obtenons ici (Fig. IX, 3 et Pl. II, 6) en essayant de caractériser la constitution essentiellement lipidique de ces vacuoles.

Cette coloration des jeunes vacuoles par le bleu d'indophénol, comme la coloration par le Soudan déjà réalisée après fixation dans le bichromate de potassium ou sans fixation comme nous le verrons

plus loin, se produit aussi bien dans la racine d'Orge que dans celle du Blé et sans que l'on observe la moindre différence entre ces deux objets d'étude. On ne saurait cependant admettre, comme nous allons le voir, une identité complète entre les constituants chimiques des jeunes vacuoles dans ces deux plantes. En écrasant la pointe des racines dans une goutte du réactif de Bouchardat ($I^2=1$ g., $IK=3$ g., $H_2O=100$ cc., acidifier par quelques gouttes d'acide acétique) nous voyons en effet apparaître dans les cellules du méristème des précipités finement granuleux, colorés en brun rouge, quand nous étudions l'Orge tandis que nous constatons l'absence de tout précipité analogue en étudiant le Blé.

Ce résultat d'ordre histochimique peut être expliqué par la présence, dans l'Orge, de l'hordénine, alcaloïde découvert par LÉGER [47]. On sait que les alcaloïdes sont surtout fréquents dans les régions de la plante en voie de croissance ou de formation [107]. De plus, CHAZE a montré que, dans les plantules de Tabac, la nicotine apparaît dans les méristèmes à l'intérieur des jeunes vacuoles [7]. Dans les mêmes vacuoles de la racine d'Orge, l'hordénine, particulièrement abondante, formerait le précipité que nous venons d'obtenir sous l'action du réactif iodo-ioduré. C'est ce que nous essayerons maintenant de confirmer en utilisant d'autres réactifs généralement employés dans l'étude des alcaloïdes [27]. Prélevons les racines d'Orge, dès le début de la germination, pour les écraser entre lame et lamelle dans une goutte de phosphomolybdate de sodium en solution à 20 p. 100 dans l'eau fortement acidifiée avec de l'acide azotique. Nous constatons la formation d'un précipité granuleux blanc jaunâtre dans les vacuoles à mesure que le réactif pénètre dans le tissu méristématique. La même précipitation peut être obtenue avec l'acide phosphotungstique ou mieux avec le réactif de Mayer ($Cl^2Hg=1$ g., $IK=4$ g., $H_2O=100$ cc.) On obtient encore un précipité, moins visible cependant, avec l'acide silicotungstique, l'acide picrique en solution à 1 p. 100 ou le chlorure d'or en solution à 5 p. 100. Au contraire, après avoir séjourné pendant une demi-heure dans l'alcool absolu additionné d'acide tartrique (procédé d'Errera), les racines d'Orge, montées dans les mêmes réactifs, ne montrent plus aucun précipité dans leur méristème, l'hordénine étant passée en solution alcoolique.

Nous pouvons d'ailleurs, avec le rouge neutre en coloration vitale, constater une différence de teinte entre le vacuome des cellules méristématiques de la racine d'Orge et celui des mêmes cellules de la racine de Blé. Pour cela, nous diluons le rouge neutre en poudre dans une solution aqueuse à 1 p. 100 d'acide borique ou de bicarbonate de soude. Dans une goutte de la solution obtenue, très faiblement acide et colorée en rouge vif, écrasons en même temps sous lamelle la pointe d'une racine de Blé et celle d'une racine d'Orge. Dans le méristème de la racine de Blé, les jeunes vacuoles prennent une coloration rouge

violacé tandis que le vacuome du méristème dans la racine d'Orge se colore en rouge orangé. Si les deux racines se trouvent suffisamment rapprochées, un grossissement assez faible permet de comparer les teintes très nettement différentes ainsi obtenues. Or, nous savons que le rouge neutre *in vitro* donne une teinte rouge violacé en milieu acide et vire au contraire au rouge orangé en milieu alcalin. La présence des lipides (lécithine, acides gras) pourrait déterminer une légère acidité du contenu vacuolaire dans les cellules du méristème, aussi bien dans la racine d'Orge que dans celle de Blé. Mais, de plus, dans les racines de Blé, comme l'a montré GUILLIERMOND [37], en rapport avec leur acidité, ces vacuoles renferment des composés oxyflavoniques tandis que les mêmes cellules des racines d'Orge n'en renferment pas. Inversement, comme nous venons de le constater ici, c'est uniquement dans les racines d'Orge que nous décelons la présence d'un alcaloïde et cela peut suffire pour expliquer le virage du rouge neutre dans le sens de l'alcalinité (1). Rappelons en effet que, d'après LÉGER [47], l'hordénine est une base forte qui bleuit le tournesol.

COLORATION DES VACUOLES PAR LE SOUDAN EN PSEUDO-SOLUTION AQUEUSE PHOSPHOLIPIDIQUE

Préparation et propriétés

de la solution aqueuse de lecithine.

Plaçons quelques grammes de lecithine dans un flacon de 50 cc. environ, complètement rempli d'eau et muni d'un bouchon à l'émeri. En quelques jours, si nous agitons assez souvent, la lecithine diffuse dans tout le liquide qui prend de ce fait un aspect laiteux et une coloration jaune de plus en plus marquée. Nous obtenons ainsi un hydrosol de lecithine.

Si nous en évaporons un certain volume, la température ne dépassant pas 40 degrés, nous récupérons la quantité correspondante de lecithine sous la forme d'un résidu pâteux, fortement coloré en jaune rouge. Ce résidu peut être entièrement dissous dans l'éther de pétrole, l'éther éthylique (oxyde d'éthyle), le chloroforme et dans l'alcool absolu. On obtient ainsi des liqueurs présentant une coloration jaune d'or; de plus, on peut vérifier que la solution alcoolique obtenue précipite par addition d'acétone ou bien sous l'action du chlorure de cadmium, dissous dans l'alcool méthylique. Par conséquent, la lecithine a conservé ses propriétés physiques essentielles, on peut d'ailleurs

(1) Ayant constaté un virage analogue BAILEY et ZIRKLE, au cours d'études approfondies, envisagent la présence dans certaines vacuoles de substances pouvant donner de grandes différences dans les déterminations colorimétriques du pH du suc vacuolaire [2].

la redissoudre dans l'eau pour obtenir de nouveau une solution aqueuse colloïdale.

Ayant ainsi retrouvé les propriétés essentielles de la lécithine, préalablement isolée de sa solution aqueuse, essayons de mettre en évidence les mêmes propriétés dans cette solution. L'éther de pétrole, l'éther éthylique ou le chloroforme que nous ajoutons à la solution aqueuse colloïdale jaune ne produisent aucune décoloration de celle-ci et forment une couche supérieure, restant incolore après agitation prolongée. (Au contraire les mêmes solvants, non miscibles avec l'eau, se colorent intensément aux dépens d'une solution aqueuse colloïdale de bleu d'indophénol qui se trouve ainsi progressivement décolorée). Il est intéressant de signaler ici que la lécithine, se trouvant en solution aqueuse, ne peut être extraite par aucun de ses solvants non miscibles avec l'eau (Fig. XII). Même simplement imbibée d'une petite quantité d'eau, cette substance est insoluble dans l'éther et dans le chloroforme. Nous pouvons donc affirmer que, dans la solution colloïdale utilisée ici, l'union existant entre la lécithine et l'eau est particulièrement étroite.

Ayant opéré comme il a été dit précédemment dans un flacon de 50 cc., par décantation nous séparons ensuite le liquide laiteux jaune de l'excès de lécithine. Ce liquide laiteux prend une coloration rouge ou noire extrêmement intense quand nous l'additionnons, en agitant, de Soudan III ou de Soudan B en poudre. Nous obtenons ainsi des pseudo-solutions aqueuses de ces colorants des lipides grâce à la présence de lécithine. Nous décantons pour séparer, de l'excès du colorant, la solution aqueuse colloïdale phospholipidique rouge ou noire avec laquelle nous essayerons, maintenant, de mettre en évidence la présence des lipides dans les vacuoles.

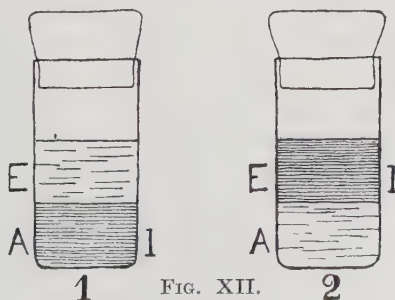


FIG. XII.

1. La lécithine *l* en solution aqueuse jaune *A* ne passe pas dans l'éther *E*.
2. La lécithine *l* en solution jaune dans l'éther *E* n'est pas entraînée par l'eau *A* (même après agitation prolongée).

Écailles bulbaires de Lis et feuilles d'Iris.

Dans cette solution aqueuse phospholipidique de Soudan, immergeons des lambeaux d'épiderme prélevés sur les écailles d'un bulbe de

Lilium candidum. Au bout de quelques jours, ces lambeaux de tissu, montés sous le microscope, montrent une coloration nettement marquée de l'ensemble du vacuome, légèrement condensé (Fig. XIII, 1). Les cellules épidermiques sont évidemment mortes mais leur structure est assez bien conservée. De plus, les concrétions intravacuolaires apparaissent intensément colorées. Ainsi se trouvent confirmés les résultats obtenus avec beaucoup plus de difficultés dans la première partie de ce travail. Mais ici la coloration par le Soudan s'étend à l'ensemble du vacuome, caractérisant ainsi sa nature lipidique (1).

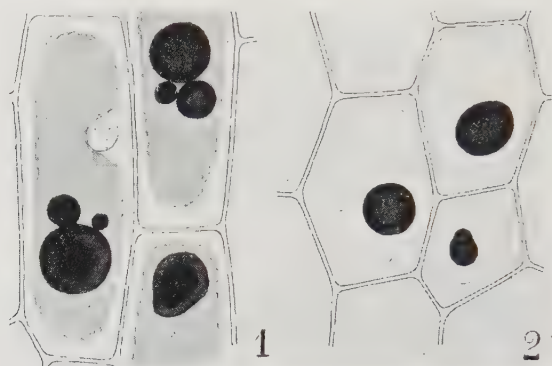


FIG. XIII. — Coloration par le Soudan en solution aqueuse phospholipidique.

1. Dans l'épiderme du bulbe de *L. candidum* : corps intravacuolaires et vacuome tout entier colorés.
2. Dans l'épiderme des feuilles d'*Iris* : corps intravacuolaires en partie dissous et seuls colorés.

On ne saurait, en effet, pensons-nous, attribuer cette coloration à l'absorption de lécithine, remplissant finalement les vacuoles, car on n'obtient pas le même résultat avec d'autres tissus épidermiques. Ainsi, dans les lambeaux d'épiderme prélevés sur les feuilles d'*Iris*, le même procédé permet bien d'obtenir la coloration des corps globuleux intravacuolaires, d'ailleurs plus ou moins désagregés (Fig. XIII, 2), mais aucune coloration d'ensemble du vacuome n'est visible. Nous pensons qu'il se produit ici, en solution aqueuse, un phénomène comparable à celui que nous avons vu se produire en solution alcoolique. La coloration par le Soudan ne se produisant qu'au bout de plusieurs jours, l'action dissolvante de l'eau suffit pour expliquer le résultat

(1) Le même vacuome peut être coloré, également en solution phospholipidique, par la chlorophylle. Nous traitons pendant 24 heures les feuilles d'épinard, préalablement broyées, par de l'eau contenant 1 p. 100 de lécithine et, simplement en décantant, nous obtenons une solution trouble vert-jaunâtre. Dans cette solution, au bout de 24 heures, les lambeaux d'épiderme prélevés sur les écailles bulbaires de *Lis* blanc présentent des concrétions intravacuolaires colorées en vert-jaune intense, l'ensemble du vacuome apparaissant en vert clair.

négatif obtenu, sur l'ensemble du vacuome, dans l'épiderme d'*Iris* ainsi que la désagrégation des corps globuleux intravacuolaires. Au contraire, dans l'épiderme du bulbe de *Lis*, étant donné la présence de lécithine dans la solution aqueuse du Soudan, le vacuome, particulièrement riche en phospholipides, n'est plus dissous par l'eau et se trouve finalement coloré par le Soudan.

Plantules de Blé : absorption de la lécithine et localisation de ce corps dans les vacuoles.

Plaçons d'abord en germination, à la température moyenne de 25 degrés, sur du papier buvard humide, des grains de Blé et d'Orge. Les plantules ayant atteint plusieurs centimètres de hauteur, introduisons-les dans des tubes à essais contenant chacun environ un centimètre cube de la solution phospholipidique du Soudan. En les poussant avec une baguette de verre, on réussit facilement à diriger vers le fond du tube l'extrémité des racines. Ainsi cultivées sur la solution aqueuse phospholipidique de Soudan III ou de noir Soudan B, les plantules se développent assez vite et nous pouvons constater en une semaine l'allongement sensible de la tige et des racines.

Au bout de plusieurs jours, prélevons les pointes des racines pour les écraser entre lame et lamelle dans une goutte d'eau. Les cellules de la coiffe et du méristème montrent une coloration plus ou moins intense de leurs vacuoles (Fig. XIV, 1), coloration particulièrement foncée si l'on opère avec la solution aqueuse phospholipidique de noir Soudan B. En cultivant de la même façon des plantules de Melon

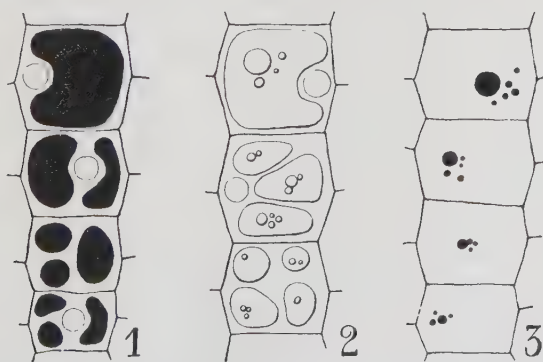


FIG. XIV. — Cellules du méristème de la racine de Blé :

1. cultivé sur la pseudo-solution aqueuse phospholipidique de Soudan;
2. cultivé sur la pseudo-solution de lécithine non additionnée de Soudan.
3. Après cette dernière culture et fixation par le bichromate, coloration par le noir Soudan B.

ou de Ricin nous observons encore, mais avec beaucoup moins de netteté, une coloration du vacuome dans les cellules situées à la pointe des racines.

Nous obtenons ainsi, dans les cellules de la coiffe et du méristème, la coloration des vacuoles tandis que le noyau et le cytoplasme restent incolores. Dans un nombre variable de cellules nous constatons de plus la présence de corps globuleux intravacuolaires colorés ou non par le Soudan. Ces corps globuleux pourraient fort bien correspondre à une localisation, dans le vacuome, de la lécithine qui serait absorbée par les racines des plantules. C'est ce que nous allons maintenant chercher à démontrer en étudiant particulièrement les racines de Blé.

Pour cela, recommençons nos cultures en plaçant les plantules de Blé sur la solution aqueuse de lécithine non additionnée de Soudan. Une petite quantité de ce liquide laiteux jaune étant versée dans les tubes à essais, nous plaçons les plantules comme il a été dit précédemment. Enfin, lorsque les tubes à essais ne présentent plus une hauteur suffisante, nous cultivons les plantules, également sur une petite quantité de la solution aqueuse de lécithine, dans des éprouvettes de grandes dimensions.

Au bout de 24 heures, prélevons les pointes de quelques racines pour les écraser entre lame et lamelle dans une goutte d'eau. Dans les cellules du méristème, nous constatons la présence de granulations intravacuolaires extrêmement fines agitées de mouvements browniens très intenses ou groupées en amas granuleux moins mobiles. Les jours suivants, on peut suivre la fusion progressive de ces granules et voir se former ainsi des globules assez volumineux. Tous ces corps apparaissent par différence de réfringence dans les jeunes vacuoles, elles-mêmes très réfringentes, et la coloration vitale au rouge neutre ne fait qu'accentuer la netteté des figures obtenues. Dans les cellules de plus grande taille, situées en arrière du méristème, des granules parfois très nombreux apparaissent d'abord, agités de mouvements browniens. On trouve ensuite ces granules souvent accolés et, la plupart d'entre eux se fusionnant, on voit, au bout de plusieurs jours, dans les vacuoles de ces grandes cellules, un ou plusieurs gros corps globuleux, parfois vésiculisés, presque toujours encore accompagnés d'un amas de fines granulations (Fig. XIV, 2).

Comme nous l'avons fait pour les concrétions étudiées au début de ce travail, nous pouvons d'abord montrer que les corps globuleux, ainsi formés, présentent une densité supérieure à celle du suc vacuolaire. En faisant pivoter le tube du microscope pour l'amener en position horizontale, la préparation se trouvant ainsi placée dans un plan vertical, nous pouvons suivre la chute des concrétions dans les vacuoles. Les corps globuleux les plus gros montent rapidement dans le champ du microscope : ils tombent en réalité dans l'espace vacuolaire. La vitesse de chute diminue rapidement quand le diamètre de ces con-

crétions décroît et l'on observe même que les plus fines granulations n'effectuent que des mouvements browniens et ne subissent pas sensiblement l'action de la pesanteur. De plus, la vitesse de chute décroît considérablement quand on étudie les corps globuleux dans les vacuoles à des stades plus jeunes, la différence de densité entre ces concrétions et le suc vacuolaire s'annulant peu à peu. Rappelons ici que MILOVIDOV [63] a montré que le vacuome des cellules méristématiques est particulièrement dense.

Après avoir écrasé dans une goutte d'eau la pointe d'une racine de Blé, cultivé sur la solution aqueuse de lécithine, ajoutons sous lamelle une goutte d'alcool. Nous voyons aussitôt tous les corps intravacuolaires se dissoudre sans laisser de traces. En utilisant, également sous lamelle, du Soudan III, en dissolution dans de l'alcool à 70 degrés ou dans de l'hydrate de chloral, la dissolution est aussi rapide et ne permet pas d'observer la moindre coloration. Par contre, le mélange nadi permet facilement d'obtenir une coloration très nette de ces corps. Si la proportion de potasse entrant dans la constitution de ce mélange est assez réduite, on obtient même une coloration des plus fines granulations par le bleu d'indophénol naissant. Ces résultats rappellent ceux que nous obtenions déjà en cultivant des plantules de Blé sur le mélange nadi, considérablement étendu avec la solution aqueuse de lécithine (Pl. II, 7).

Ces corps intravacuolaires ne présentent pas de biréfringence. Ils se colorent pourtant comme la lécithine en jaune clair sous l'action du réactif iodo-ioduré peu concentré, en jaune brun sous l'action du même réactif concentré. Ils présentent de plus les colorations qui distinguent, d'après LOISEL, la lécithine des graisses neutres avec le violet de gentiane, l'orange G, le vert de méthyle et la fuchsine acide. Plaçons enfin les pointes des racines, ayant poussé sur la solution aqueuse de lécithine, dans du bichromate de potassium à 3 p. 100 pendant 48 heures. Après lavage prolongé dans l'eau courante, transportons ces pointes de racines dans la solution alcoolique à 70 degrés de noir Soudan B pendant 24 heures, puis écrasons-les entre lame et lamelle dans une goutte de glycérine gélatinée. Nous observons une coloration noir foncé des corps globuleux et des granulations intravacuolaires (Fig. XIV, 3). Ces mêmes corps, également fixés dans le bichromate, se colorent en noir par l'hématoxyline de Kultchitsky suivant le procédé de Smith-Dietrich. Nous vérifions ainsi la nature phospholipidique des concrétions formées dans les vacuoles et leur complète identité avec la lécithine utilisée.

Cette substance est donc progressivement absorbée par les cellules situées à l'extrémité des racines et constitue les concrétions globuleuses intravacuolaires que nous venons d'étudier. En suivant la condensation progressive de la lécithine à l'intérieur des vacuoles nous retrouvons, mais en sens inverse, les étapes qui marquent la dissolution de ce

corps *in vitro*. On a pu constater, en effet, que la lécithine, en présence d'une quantité suffisante d'eau, se divise d'elle-même en petites boules microscopiques et innombrables dont les plus petites présentent un mouvement brownien très actif [43]. Remarquons, d'autre part, que la lécithine ne semble pas se trouver fixée par le complexe lécithostéroprotéidique, constituant probable du cytoplasme. Il n'apparaît aucun corps figuré intracytoplasmique; c'est donc que le complexe conserve avec sa constitution normale la propriété qu'on lui attribue de donner des solutions colloïdales parfaitement limpides, aussi pauvres en granules microscopiques que du blanc d'œuf frais [55]. Par contre, la solution colloïdale intravacuolaire se trouble et présente des granules de lécithine, cette substance paraissant se trouver ainsi à l'état libre.

Au bout d'une semaine, ainsi cultivées sur la solution aqueuse de lécithine, les plantules de Blé de 4 ou 5 cm. atteignent 14 cm. de hauteur moyenne. Nous pouvons alors constater la présence de corps globuleux intravacuolaires dans les cellules situées au-dessus du méristème à plus d'un centimètre de la pointe des racines. Si nous cultivons ensuite quelques unes de ces plantules pendant une semaine sur de l'eau de source elles atteignent une hauteur moyenne de 17 cm. et tous les corps concrétionnés dans les vacuoles des cellules à l'extrémité des racines disparaissent à peu près complètement. Les autres plantules se trouvant au contraire replacées sur une nouvelle solution de lécithine, pendant une semaine également, atteignent de 20 à 22 cm. de hauteur et présentent toujours des corps globuleux intravacuolaires à la pointe de leurs racines. La lécithine, loin de gêner le développement du Blé, se trouve donc absorbée et progressivement assimilée.

Les résultats que nous fournit ainsi l'étude cytochimique s'accordent avec les connaissances acquises en physiologie. Nous savons, en effet, que la lécithine constitue un aliment pour les plantes supérieures depuis que STOKLASA a pu cultiver l'Avoine dans un milieu où la lécithine représentait l'unique source de phosphore [100]. Mais nous avons ici, sur les conditions mêmes dans lesquelles se produit cette absorption, une donnée nouvelle : le passage du suc vacuolaire dans le cytoplasme. Nous avons déjà vu, d'ailleurs, le bulbe de *L. candidum* étant placé dans l'étuve, les concrétions lipidiques intravacuolaires se dissoudre en même temps que dans le cytoplasme apparaissaient des grains d'amidon. Les phospholipides, déversés dans les vacuoles, peuvent donc être réabsorbés par la matière vivante.

Essayons d'obtenir maintenant la coloration vitale par le rouge neutre en même temps que l'absorption de la lécithine. Introduisons pour cela 1 p. 1000 de rouge neutre en poudre dans la solution aqueuse de lécithine. La liqueur obtenue étant versée en petite quantité dans le fond des tubes à essais, nous commençons une nouvelle série de

cultures de plantules de Blé. Les jours suivants, nous pouvons constater, en écrasant sous lamelle, dans une goutte d'eau, l'extrémité des racines, la présence de granulations et de corps globuleux intensément colorés dans les vacuoles des cellules de la coiffe et du méristème. La présence du rouge neutre étendu ne gêne donc pas l'absorption de la lécithine par les racines de Blé. D'autre part, l'ébullition, prolongée pendant une demi-heure, ne produit qu'un léger brunissement de la solution aqueuse colloïdale de lécithine. La solution jaune brun obtenue servant de milieu de culture pour des plantules de Blé nous observons encore, au bout de plusieurs jours, l'apparition de granulations et de corps globuleux dans les vacuoles des cellules situées à la pointe des racines.

La lécithine libre, absorbée par les cellules, se trouve donc concrétionnée à l'intérieur des vacuoles. Le vacuome nous paraît ainsi constituer, dans la cellule, un lieu d'accumulation pour les phospholipides.

PIGMENTS ANTHOCYANIQUES
ET COMPOSÉS OXYFLAVONIQUES ASSOCIÉS
AUX LIPIDES INTRAVACUOLAIRES

Nous avons montré précédemment que le vacuome des cellules épidermiques, dans les pièces florales comme à la base des feuilles d'*Iris*, est essentiellement constitué par des substances lipidiques, particulièrement par des phytostérides. Les *Iris* des jardins de la variété *simile* nous ont donné des résultats particulièrement nets, la solution colloïdale intravacuolaire apparaissant fortement concentrée et concrétionnée sous forme de volumineuses masses, le plus souvent sphériques, sur une grande étendue de l'épiderme foliaire. Or, dans ces vacuoles, GUILLIERMOND a particulièrement étudié les composés oxyflavoniques et les pigments anthocyaniques; il a montré leur accumulation dans les corps globuleux intravacuolaires dont nous venons de préciser ici la nature lipidique.

La face interne des feuilles d'*Iris* reste parfaitement blanche et les corps globuleux intravacuolaires sont toujours incolores dans les cellules épidermiques. Au contraire, sur la face externe, l'épiderme présente généralement, un peu au-dessus de la base des feuilles, un pigment rouge pâle; les corps globuleux apparaissent alors avec une teinte rouge plus accentuée que celle du suc vacuolaire. Dans certaines cellules même, le suc vacuolaire semble rester incolore et tout le pigment paraît se trouver localisé dans le corps globuleux. Quelques cellules de cette région ne produisent pas d'anthocyane mais renferment, dans leurs vacuoles, un pigment jaune (composé oxyflavonique);

le corps globuleux apparaît alors avec une teinte beaucoup plus accusée que celle du suc vacuolaire. Dans les sépales et les pétales des fleurs d'*Iris germanica*, GUILLIERMOND a suivi l'apparition du pigment anthocyannique, sur le trajet des nervures, à l'intérieur des vacuoles des cellules épidermiques : les corps globuleux intravacuolaires prennent progressivement une teinte brun rougeâtre foncé tandis que le reste du vacuome passe du rose très clair au rouge. Les cellules de l'extrémité des poils des sépales offrent, en même temps qu'un pigment xanthophyllien, un pigment oxyflavonique de couleur jaune assez marquée; les corps globuleux intravacuolaires apparaissent alors colorés en jaune plus intensément que le reste des vacuoles. Dans les stigmates le pigment anthocyannique colore les corps globuleux intravacuolaires en violet de plus en plus foncé tandis que le suc vacuolaire, d'abord incolore, prend une légère teinte violette [33].

Les feuilles de Chou rouge (*Brassica oleracea*, var. *capitata*) renferment, comme l'a montré MOLISCH, des cristaux de pigment anthocyannique [74]. Mais, de plus, les cellules épidermiques de ces feuilles présentent fréquemment un ou plusieurs corps sphériques de couleur plus accentuée que celle du suc vacuolaire. GUILLIERMOND montre que ces corps ne peuvent être considérés comme des gouttelettes d'anthocyane amorphe : ils correspondent aux corps globuleux intravacuolaires étudiés dans l'épiderme des feuilles et des fleurs d'*Iris*. Des corps analogues ont, d'autre part, été découverts par SOSTER dans l'épiderme des feuilles d'*Haworthia cymbiformis* et nous avons pu caractériser ici leur nature essentiellement lipidique. Or, dans ces corps globuleux intravacuolaires, d'abord incolores puis ensuite colorés en jaune verdâtre, SOSTER a pu mettre en évidence la présence de composés oxyflavoniques [99].

Ainsi des pigments anthocyaniques et des composés oxyflavoniques nous apparaissent, dans un certain nombre de cas, étroitement unis aux lipides intravacuolaires. Voyons maintenant si la même union peut être réalisée dans l'épiderme du bulbe de Lis où la nature du vacuome est particulièrement nette. Rappelons que, dans les fleurs de *Lilium speciosum*, GUILLIERMOND a constaté la présence de corps globuleux apparaissant colorés en rouge plus intensément que le suc vacuolaire, corps dont nous avons ici même caractérisé la constitution lipidique. Comme l'a montré MIRANDE, les écailles du bulbe de Lis blanc étant exposées à la lumière, un pigment anthocyannique apparaît dans l'assise sous-épidermique [64]. Jamais l'épiderme n'apparaît pigmenté et les concrétions lipidiques intravacuolaires (correspondant aux stérinoplastes de MIRANDE) sont toujours parfaitement incolores. Aussi chercherons-nous tout d'abord à réaliser la coloration des vacuoles et des corps lipidiques intravacuolaires, dans l'épiderme du bulbe de Lis blanc, en utilisant le pigment anthocyannique extrait des feuilles du Chou rouge.

Coloration par le pigment anthocyanique

extrait du Chou rouge.

Les feuilles de Chou rouge étant découpées en lanières avec des ciseaux, laissons-les macérer pendant 24 heures dans de l'alcool à 95 degrés. Nous obtenons ainsi, après filtration, une liqueur colorée en rouge vif qui nous donne, par évaporation à sec, un résidu brun noir. En reprenant avec un peu d'eau nous avons enfin une solution trouble fortement colorée en rouge brun. Dans cette solution, immergeons des lambeaux de tissu épidermique prélevé sur les écailles du bulbe de *Lilium candidum*. C'est seulement au bout de plusieurs jours que nous pouvons observer nettement, dans les cellules épidermiques, une coloration jaune assez intense des concrétions intravacuolaires et une coloration plus claire de l'ensemble du vacuome. Cette lenteur de la coloration rappelle les résultats précédemment obtenus, avec le Soudan, en solution aqueuse phospholipidique. C'est que l'alcool doit probablement extraire des feuilles de Chou rouge, en même temps que l'anthocyane, les substances intravacuolaires auxquelles le pigment se trouve normalement lié. Quand nous reprenons ensuite par l'eau, le pigment reste fixé sur ces substances, dans la solution rouge brun trouble utilisée pour les colorations.

Pour éviter de dissoudre les substances intravacuolaires accompagnant l'anthocyane et, notamment, les phospholipides, employons, au lieu d'alcool, l'acétone qui permet d'extraire en un temps minimum le pigment anthocyanique du Chou rouge. Les fragments de feuilles, placés dans quelques centimètres cubes d'acétone, nous donnent en dix minutes, si nous agitions de temps en temps, une liqueur intensément colorée en violet. Décantons immédiatement cette solution acétonique d'anthocyane et laissons-la s'évaporer à la température ordinaire. Le résidu violet obtenu est très soluble dans l'eau et permet d'obtenir une liqueur intensément colorée en violet. Un lambeau d'épiderme, prélevé sur le bulbe de *L. candidum*, étant immergé dans cette solution nous pouvons constater, sous le microscope, que le pigment pénètre rapidement dans les cellules en provoquant une plasmolyse intense. Il colore particulièrement les concrétions intravacuolaires mais il donne, en même temps, à l'ensemble du vacuome une teinte bleue, violette ou rouge très marquée. Le noyau ne présentant, par contre, aucune coloration nous obtenons ainsi des figures comparables à celles que donne le rouge neutre en coloration vitale (Pl. I). Cependant cette pénétration du pigment anthocyanique dans les cellules épidermiques paraît les tuer assez rapidement. On ne peut, en effet, avec une solution hypertonique de chlorure de sodium, obtenir la plasmolyse des cellules ainsi colorées intensément par l'anthocyane.

Nous obtenons, d'autre part, un résultat analogue en utilisant simplement le jus frais d'oranges très sanguines qui doit sa coloration à la présence de pigment anthocyannique [105]. Dans ce liquide rose l'épiderme prélevé sur une écaille du bulbe de Lis blanc se trouve rapidement coloré : les concrétions intravacuolaires apparaissent en rouge dans le vacuome rose clair.

Si nous laissons maintenant macérer les feuilles de Chou rouge, pendant 24 heures, dans l'acétone nous obtenons une liqueur colorée en rouge vif. Ce virage semble montrer qu'il s'est produit une acidification mais, en même temps, la solution est en partie décolorée. Après évaporation à sec, le résidu violet se dissout facilement dans quelques centimètres cubes d'eau et nous pouvons encore, mais avec beaucoup moins de netteté, réaliser en quelques minutes la coloration des concrétions intravacuolaires et du vacuome dans les cellules épidermiques du bulbe de Lis blanc. D'autre part, si nous effectuons, en dix minutes seulement, une extraction avec de l'alcool, la solution est beaucoup moins intensément colorée qu'avec de l'acétone. Le résidu de l'évaporation à sec étant dissous dans un peu d'eau, nous obtenons pourtant, en quelques minutes, la coloration de quelques concrétions intravacuolaires dans un lambeau d'épiderme prélevé sur le bulbe de Lis blanc.

Pour obtenir dans les meilleures conditions une coloration avec le pigment anthocyannique du Chou rouge il faut donc l'extraire, en un temps minimum, au moyen d'acétone. La solution acétonique d'anthocyane est ensuite évaporée à sec puis nous reprenons avec un peu d'eau. Dans une goutte de cette solution colorante, écrasons maintenant, sous lamelle, l'extrémité des racines de Blé (*Triticum sativum*) ou d'Orge (*Hordeum vulgare*). Les cellules de la coiffe et du méristème sont rapidement désorganisées et le pigment anthocyannique colore même les noyaux. Il faut donc opérer ici plus délicatement et cultiver, comme nous l'avons fait pour le bleu d'indophénol et pour le Soudan, les plantules entières sur la solution colorante assez diluée. Dans ces conditions, au bout de 24 heures, en écrasant sous lamelle l'extrémité des racines, nous observons une coloration bleue très claire des vacuoles. Quand la teinte s'accroît, les cellules sont mortes, elles présentent alors une coloration violette ou rouge très foncée. Enfin, souvent le pigment anthocyannique ne pénètre pas dans les cellules, il se trouve fixé par les membranes cellulodiques qui présentent une teinte bleue intense.

Caractérisation des composés oxyflavoniques dans les écailles en voie de dessiccation.

Si nous prélevons un lambeau d'épiderme sur une écaille moyenne, normale, du bulbe de *Lilium candidum* nous constatons, sous le microscope, un brunissement à peine appréciable des vacuoles sous l'action du perchlorure de fer en solution aqueuse. Au contraire, si le lambeau d'épiderme est prélevé sur une écaille périphérique en voie de dessiccation, le même réactif provoque un noircissement très net du vacuome. Nous obtenons des résultats du même ordre avec l'acétate de plomb en solution aqueuse : le vacuome concrétionné sous forme de pelotons dans l'épiderme des écailles sèches prend, avec ce réactif, une teinte jaune très marquée. D'autres réactions, étudiées par GUILLIERMOND et GAUTHERET [39], nous permettent de confirmer l'importance que prennent les composés oxyflavoniques dans le vacuome de ces écailles en voie de dessiccation. Sous l'action de la potasse en solution aqueuse concentrée, les masses concrétionnées en pelotons dans l'épiderme des écailles sèches se dissolvent rapidement tandis qu'apparaît une coloration jaune très intense de l'ensemble du vacuome. Un jaunissement moins intense est, d'autre part, produit par le bichromate de potassium ou par l'acide chromique ainsi que par le chloromolybdate d'ammonium ou l'acétotungstate de soude.

Les composés oxyflavoniques, ainsi mis en évidence dans l'épiderme des écailles en voie de dessiccation, se trouvent entraînés en solution par l'alcool même très étendu et c'est ainsi que nous avons pu les étudier au cours de nos vérifications *in vitro* précédentes (p. 47) L'extrait alcoolique des écailles sèches, que nous avons alors préparé, présentait une coloration jaune brun et nous avons obtenu, avec l'acétate de plomb en solution aqueuse, la formation d'un précipité jaune correspondant aux composés oxyflavoniques. D'autre part, l'addition de perchlorure de fer en solution aqueuse déterminait bien un brunissement sans précipitation.

Dans les écailles n'ayant encore subi aucun commencement de dessiccation, les composés oxyflavoniques se trouvant en solution diluée sont plus difficilement mis en évidence. Les vacuoles présentent cependant déjà une coloration assez intense, avec le perchlorure de fer par exemple, mais nous pouvons constater que les concrétions, lipidiques intravacuolaires restent toujours absolument incolores. Ce dernier résultat peut être également obtenu avec les autres réactifs précédemment employés : les composés oxyflavoniques ne paraissent donc pas être fixés par les lipides que l'on trouve déjà concrétionnés à l'intérieur des vacuoles, avant toute dessiccation. Au contraire, dans l'épiderme des écailles desséchées, les masses en pelotons qui remplissent

à peu près complètement les cellules épidermiques mortes résultent, comme nous l'avons montré, de la précipitation globale du vacuome. Avec les phospholipides, ainsi concrétionnés, doivent donc être précipitées les diverses substances entrant dans la constitution du suc vacuolaire et, notamment, comme nous le voyons ici, les composés oxyflavoniques.

CONCLUSION

Dans les coupes, effectuées au microtome après inclusion dans la paraffine, les vacuoles apparaissent ordinairement vidées de leur contenu. Cependant, après fixation suivant la méthode de Regaud, comme l'a montré GUILLIERMOND, dans un certain nombre de cas, le vacuome est en partie conservé sous forme de précipités intravacuolaires colorés par l'hématoxyline. Cette conservation peut être attribuée à la présence de bichromate de potassium dans le mélange fixateur. Or, nous avons constaté, dans la première partie de ce travail, que les corps lipidiques concrétionnés à l'intérieur des vacuoles deviennent, après fixation dans le bichromate de potassium, insolubles dans l'alcool. De plus, dans le mélange fixateur de Regaud, grâce à la présence de bichromate, les mêmes corps se trouvent en partie désagrégés mais non dissous par le formol. Nous pouvons donc penser que le contenu même des vacuoles, lorsqu'il est essentiellement constitué par des stérides et des phospholipides, se trouve conservé par le fixateur de Regaud. C'est ce que nous venons de démontrer en obtenant la coloration des vacuoles par le noir Soudan B ou par le rouge Soudan III, après fixation dans le bichromate de potassium ou dans le mélange de Regaud.

En rapport avec la présence de lipides dans ces vacuoles, nous obtenons, d'autre part, des colorations vitales avec le bleu d'indophénol en diluant considérablement le mélange nadi. Les résultats obtenus paraissent, toutefois, beaucoup moins probants, car le bleu d'indophénol colore également les vacuoles tannifères. D'autre part, les vacuoles peuvent être colorées par le Soudan en pseudo-solution aqueuse phospholipidique; nous avons vu que la lécithine peut être, en même temps, absorbée et progressivement accumulée dans le vacuome.

Dans ces vacuoles, les lipides coexistent avec les divers produits de l'activité cellulaire : avec l'hordénine dans le méristème de la racine d'Orge, avec les composés oxyflavoniques et les pigments anthocyaniques assez souvent dans les cellules épidermiques. Quand les vacuoles sont dépourvues de pigments anthocyaniques, comme dans l'épiderme du bulbe de Lis, nous pouvons expérimentalement obtenir la coloration des lipides intravacuolaires avec le pigment extrait du Chou rouge.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les cellules végétales peuvent donc accumuler des substances lipidiques (stérides, phospholipides) à l'intérieur de leurs vacuoles. Cette nouvelle fonction étant mise en évidence, essayons, en nous résumant, d'en fixer ici le déterminisme et la portée.

Cette accumulation de lipides intravacuolaires paraît résulter de l'abaissement de la température à laquelle s'effectue la végétation. Ainsi, le bulbe de *Lilium candidum* végétant normalement en plein hiver, nous constatons toujours la présence, dans les cellules épidermiques, de nombreuses concrétions lipidiques intravacuolaires amorphes ou cristallisées. Le même bulbe végétant à plus haute température (dans l'étuve, en serre chaude ou dans les pays chauds) ne montre plus ces concrétions. D'autre part, les fleurs de *L. candidum* et de *L. longiflorum Harrisii* présentent, dans leurs pièces florales, des substances lipidiques, concrétionnées à l'intérieur des vacuoles, quand la floraison est obtenue, par forçage, en plein hiver ou dès le début du printemps; plus tard, elles ne contiennent aucune formation analogue. Les feuilles d'*Iris germanica*, surtout de la variété *simile*, présentent des globules lipidiques intravacuolaires plus nombreux et plus gros en décembre, en plein hiver. Enfin, nous retrouvons des corps analogues dans les pièces florales des *Pogoniris* tandis que nous constatons leur absence complète dans les *Iris Apogon* dont la floraison est, d'une manière générale, moins précoce.

Les substances lipidiques s'accumulant ainsi dans le vacuome paraissent formées aux dépens des glucides. Nous constatons, en effet, l'absence d'amidon dans les cellules épidermiques du bulbe de Lis blanc quand il végète normalement en hiver. Au contraire, lorsque ce bulbe se trouve placé à une température suffisamment élevée, en même temps que les concrétions lipidiques intravacuolaires disparaissent complètement, nous pouvons suivre l'apparition de nombreux grains d'amidon dans les cellules épidermiques. Rappelons que GAUTHERET a constaté, dans les plantules d'Orge cultivées sur milieux glucosés, la formation de corps lipidiques intravacuolaires [25].

Nous obtenons, en quelques jours, l'apparition de concrétions lipidiques à l'intérieur des vacuoles, dans les cellules situées à la pointe des racines, quand nous cultivons les plantules de Blé sur une solution aqueuse colloïdale de lécithine. Les colloïdes intravacuolaires peuvent donc présenter, en un temps relativement court, un enrichissement considérable en phospholipides.

Les vacuoles qui présentent une constitution essentiellement lipidique pourraient être rapprochées, du point de vue histochimique, du

chondriome. Mais la différence essentielle réside toujours dans l'hydrophilie des colloïdes intravacuolaires, peut-être en rapport avec la valeur particulière et les variations du coefficient lipocytyque [60]. Nos recherches nous permettent de constater, dans l'épiderme des bulbes de Lis et des feuilles d'*Iris* en voie de dessiccation, la disparition rapide des stérols et stérides.

Les propriétés particulières des lipoïdes (stérides et phospholipides) servaient déjà de base à l'hypothèse d'OVERTON [77]. Dans les théories plus modernes de la perméabilité cellulaire, les phospholipides jouent encore un rôle important : fixés sur un nucléoprotéide, d'après GRAFE, ils constituent l'une des phases du système colloïdal péri-plasmique envisagé par HANSTEEN-CRANNER [voir 103]. Notre étude portant exclusivement sur le système vacuolaire, il ne peut être question d'envisager ici la pénétration des colorants vitaux dans le cytoplasme mais bien, en nous limitant étroitement aux cas étudiés, le passage de ces colorants du cytoplasme dans les vacuoles et leur accumulation dans ces enclaves aqueuses de la matière vivante.

Au cours de ce travail nous avons toujours pu observer, d'abord, directement les jeunes vacuoles, leur contenu présentant une réfringence supérieure à celle du cytoplasme. Quand nous employons, ensuite, un colorant vital comme le rouge neutre, la netteté des figures étudiées devient plus grande mais on n'observe jamais la moindre altération. Nous avons, même, indirectement, constaté que le rouge neutre ne modifie pas la viscosité du suc vacuolaire puisque les concrétions lipidiques tombent avec la même vitesse lorsque le vacuome se trouve vitalement coloré. Rappelons ici que GUILLIERMOND a pu suivre la coloration du système vacuolaire pendant la croissance d'un *Saprolegnia*, dans des milieux additionnés de colorants vitaux et observer un développement normal de ce Champignon tant que le colorant vital n'est pas trop concentré [31]. En collaboration avec DUFRENOY et LABROUSSE il a montré également que, les graines de Tabac germant dans des milieux synthétiques additionnés de colorants vitaux, le vacuome apparaît coloré pendant le développement des plantules [38]. D'autre part, EICHORN ne constate aucun ralentissement de la croissance des racines d'*Allium* en présence de rouge neutre [19].

Quand nous employons un mélange « nadi » dans lequel la dose de potasse a été fortement réduite, le système vacuolaire peut rester à peu près intact, il se trouve cependant toujours un peu contracté. De plus, nous trouvons dans les vacuoles, légèrement teintées par le bleu d'indophénol, des granules myéliniformes intensément colorés. Pour opérer, d'une manière plus délicate, cette coloration, nous diluons le mélange nadi, ordinairement employé, dans cent fois son volume d'eau de source et nous cultivons, sur la solution ainsi obtenue, diverses plantules. Au bout de 24 heures, en moyenne, nous pouvons constater, en écrasant la

pointe des racines sous lamelle, que le bleu d'indophénol s'est accumulé dans les vacuoles, dans lesquelles nous trouvons, plus intensément colorées, de très fines granulations. Ainsi, nous obtenons des figures rappelant celles que donne un colorant vital comme le rouge neutre : le bleu d'indophénol se trouvant fixé exclusivement sur le système vacuolaire et la teinte présentée par les vacuoles étant d'autant plus foncée que la cellule est plus jeune. Mais notons soigneusement certaines différences : le bleu d'indophénol colore, en même temps que les vacuoles, les globules lipidiques dans le cytoplasme, de plus, quand elles apparaissent colorées en bleu, les vacuoles filamenteuses, dans les cellules du méristème, se trouvent gonflées, nettement arrondies.

Malgré ces différences, la coloration que nous obtenons ainsi, avec le bleu d'indophénol, rappelle d'assez près les résultats que donne, dans les mêmes vacuoles, un colorant vital, comme le rouge neutre. D'ailleurs, la coloration par le bleu d'indophénol étant réalisée dans les cellules situées à l'extrémité des racines, si nous ajoutons, sous lamelle, du rouge neutre, nous voyons aussitôt les précipités intravacuolaires, précédemment colorés en bleu intense, prendre une teinte violette de plus en plus accentuée tandis que l'ensemble de la vacuole passe du bleu clair au violet puis au rouge, le cytoplasme et le noyau restant parfaitement incolores. Lorsque les vacuoles paraissent être essentiellement constituées par des substances lipidiques nous pouvons envisager un coefficient de partage des colorants, tels que le bleu d'indophénol et le rouge neutre, s'établissant entre le cytoplasme et le vacuome. Les colloïdes intravacuolaires pourraient alors dissoudre électivement ces colorants à l'intérieur de la cellule; le rouge neutre et le bleu d'indophénol sont, en effet, particulièrement solubles dans les stériles et phospholipides. Cette explication ne vaut évidemment que dans les cas où nous avons pu mettre en évidence la constitution essentiellement lipidique du système vacuolaire.

Ces colorations du système vacuolaire, comparables aux colorations vitales réalisées avec le rouge neutre, ne peuvent être obtenues avec le bleu d'indophénol que si l'on cultive les plantules sur des solutions colorantes extrêmement diluées. Dans ces conditions, le colorant se trouve absorbé et progressivement accumulé dans les vacuoles des cellules situées à la pointe des racines. Cette accumulation pourrait être rapprochée des résultats obtenus par SCHLÆSING, en ce qui concerne l'utilisation par les plantes des solutions nutritives (acide phosphorique, potasse) extrêmement peu concentrées [96].

Particulièrement dans le Lis et l'Iris, les vacuoles devenant de plus en plus grandes dans les cellules en voie de différenciation, nous constatons une diminution progressive de leur réfringence particulière. Ces stériles et phospholipides en solution colloïdale se trouvant ainsi fortement dilués, doivent perdre une grande partie de leur pouvoir dissolvant. Nous observons, en effet, une coloration de plus en plus

faible des vacuoles, avec les colorants vitaux. Par contre, les concrétions intravacuolaires, constituées par des stérides et phospholipides condensés, accumulent les mêmes colorants.

On sait que la lécithine et le cholestérol forment *in vitro* un système dans lequel le cholestérol est une phase dispersée dans le milieu de dispersion lécithine [43]. Quand ils existent en assez grande quantité dans les vacuoles, les phospholipides doivent donc également constituer le milieu de dispersion du système colloïdal intravacuolaire, jouant ainsi le rôle principal dans l'absorption des substances dissoutes et notamment des colorants vitaux. Pour souligner l'importance des phospholipides intravacuolaires rappelons ici les résultats obtenus dans l'épiderme du bulbe de Lis blanc. Sous l'effet de l'élévation de la température, les masses concrétionnées à l'intérieur des vacuoles se désagrègent par suite d'un phénomène physico-chimique complexe, rappelant l'altération de la lécithine à l'air *in vitro*. D'autre part, les plantules de Blé étant cultivées sur une solution aqueuse colloïdale de lécithine, nous avons pu suivre l'absorption progressive de cette substance, apparaissant concrétionnée dans les vacuoles. Enfin, nous constatons que ces phospholipides, se trouvant accumulés dans les vacuoles par suite de l'abaissement de la température (bulbe de Lis) ou de la culture en présence de lécithine (racine de Blé), peuvent être réabsorbés par la matière vivante.

Les concrétions intravacuolaires, étudiées dans la première partie de notre travail, présentent, non seulement les caractères des stérides et des phospholipides, mais donnent également les colorations habituelles des mucilages. On sait que la présence de substances mucilagineuses dans les vacuoles modifie la solubilité du tanin, comme l'ont montré les recherches de LLOYD, MELL, CLARK, MICHEL-DURAND [voir 9, II, p. 140]. Les corps lipidiques intravacuolaires étudiés ici restent, au contraire, très solubles dans l'alcool, l'acétone : ils ne pourraient donc se trouver associés qu'à des mucilages présentant les mêmes caractères de solubilité. Rappelons que l'on a trouvé des mucilages solubles dans l'alcool [1]. Cependant nous avons pu réaliser, sous lamelle, la coloration des figures myéliniques, formées par un globule de lécithine monté dans l'eau, avec l'un des « réactifs » des mucilages : le rouge de ruthénium. Les mêmes colorants peuvent donc être adsorbés par des lipides purs et par des substances mucilagineuses, la coloration devant surtout être attribuée à la constitution physique des corps étudiés. Dans ces conditions, nous ne pouvons affirmer l'existence de complexes mucilages-lipides dans les vacuoles des cellules végétales étudiées au cours de ce travail,

BIBLIOGRAPHIE

1. AUGIER (J.). — Constitution et biologie des Rhodophycées d'eau douce. *Thèse Sciences, Paris, 1934.*
2. BAILEY (I. W.) et ZIRKLE (C.). — The cambium and its derivative tissues. VI. The effects of hydrogen ion concentration in vital staining. *Journ. of gen. Physiology, 14, 363, 1931.*
3. BARRAL (E.). — Précis d'analyse chimique biologique générale. *Baillière, Paris, 1925.*
4. BERTRAND et THOMAS. — Guide pour les manipulations de chimie biologique. *Dunod, 2^e éd., Paris, 1919.*
5. BOIS (D.). — Dictionnaire d'horticulture. *Klincksieck, Paris, 1893-99.*
6. CARLES (J.). — Chimisme et classification chez les *Iris*. *Thèse Sciences, Paris, 1934.*
7. CHAZE (J.). — Contribution à l'étude biologique des alcaloïdes du Tabac. *Ann. Sc. nat., 14, 1932.*
8. COMBES (R.). — Recherches microchimiques sur les pigments anthocyaniques. *Assoc. franç. avanc. Sciences, Dijon, 1911.*
9. ID. — La vie de la cellule végétale. *A. Colin, Paris, 1927-29.*
10. COSTER (Ch.). — Die Fettumwandlung im Baumkörper in der Tropen. *Ann. Jard. Bot. Buitenzorg, 35, 71, 1925.*
11. DANGEARD (P.-A.). — Nouvelles recherches sur le système vacuolaire. *Bull. Soc. bot. Fr., 1916.*
12. DERRIEN et TURCHINI. — De la caractérisation cytochimique des enclaves albuminoïdes. *Bull. Soc. méd. et biol. de Montpellier, 5, 174, 1924.*
13. DEVAUX (H.). — Les membranes d'albumine : rigidité, élasticité et insolubilité de ces membranes. *C. R. Soc. Biol., 119, 1124, 1935.*
14. DRAGENDORFF. — Die qualitative und quantitative Analyse von Pflanzen und Pflanzenteilen. *Göttingen, 1882.*
15. DUCLAUX (J.). — Les colloïdes. *Gauthier-Villars, Paris, 1920.*
16. ID. — Traité de chimie physique appliquée à la biologie. *Hermann, Paris, 1934.*
17. DYKES (W.-R.). — The Genus *Iris*. *University Press, Cambridge, 1913.*
18. ID. — A handbook of garden Irises. *Hopkinson, London, 1924.*
19. EICHHORN (A.). — Action des colorants vitaux sur la croissance de la racine. *C. R. Soc. Biol., 103, 374, 1930.*
20. EMBERGER (L.). — Nouvelles recherches sur le chondriome de la cellule végétale. *Rev. gén. Bot., 39, 1927.*
21. FAMIN (A.). — Action de la température sur les végétaux. *Rev. gén. Bot., 45, 1933.*
22. FRÉMY. — Chimie des végétaux. *Encyclopédie chimique. Dunod, Paris, 1885.*
23. FREY (A.). — Études sur les vacuoles à cristaux des Clostéries. *Rev. gén. Bot., 38, 273, 1926.*
24. GAUTHERET (R.). — Sur la présence de lipides dans les vacuoles des plantules d'Orge. *C. R. Soc. Biol., 116, 809, 1934.*

25. ID. — Recherches sur la culture des tissus végétaux. *Thèse Sciences, Paris, 1935.*
26. GICKLHORN. — Beobachtung zur Frage über Form, Lage und Entstehung der Golgi Binnen apparato. *Protoplasma, 1929.*
27. GORIS (A.). — Localisation et rôle des alcaloïdes et des glucosides. *Lechevalier, Paris, 1914.*
28. GROSS. — *Zeitschr. f. wiss. Mikrosk., 47, 1930.*
29. GUILLIERMOND (A.). — Sur la plasmolyse des cellules épidermiques de la feuille d'*Iris germanica*. *C. R. Ac. Sc., 166, 222, 1918.*
30. ID. — Sur les microsomes et les formations lipoides de la cellule végétale. *C. R. Ac. Sc., 172, 1676, 1921.*
31. ID. — Culture d'un *Saprolegnia* en milieux nutritifs additionnés de rouge neutre. Valeur de la méthode de coloration vitale. *Bull. Hist. appl., 7, 88, 1930.*
32. ID. — Sur la présence d'un corps d'aspect oléagineux dans les vacuoles des cellules épidermiques des feuilles d'*Iris germanica* et sur sa signification. *C. R. Soc. Biol., 109, 1182, 1932.*
33. ID. — Recherches cytologiques sur les pigments anthocyaniques et sur les composés oxyflavoniques. *Rev. gén. Bot., 45, 1933.*
34. ID. — Sur certaines particularités cytologiques d'un *Saprolegnia* : dégénérescence mucilagineuse et production de sphéro-cristaux dans le suc vacuolaire. *C. R. Soc. Biol., 116, 805, 1934.*
35. ID. — Les constituants morphologiques du cytoplasme : le vacuome ou système vacuolaire. *Actualités sc. et ind., 170. Hermann, Paris, 1934.*
36. ID. — Sur la nature et la signification de l'appareil de Golgi. *C. R. Ac. Sc., 198, 765, 1934.*
37. ID. — Nouvelles recherches sur la nature et la signification des formations dites de Golgi. *Rev. de Cytologie et de Cytoph. végétales, 1, 197, 1935.*
38. GUILLIERMOND, DUFRÉNOY et LABROUSSE. — Germination des graines de Tabac dans des milieux synthétiques additionnés de rouge neutre et coloration du vacuome pendant le développement des plantules. *C. R. Ac. Sc., 190, 1439, 1930.*
39. GUILLIERMOND et GAUTHERET. — Caractères microchimiques des composés oxyflavoniques, leur localisation dans les vacuoles. *C. R. Ac. Sc., 196, 369, 1933.*
40. GUILLIERMOND, MANGENOT et PLANTEFOL. — Traité de Cytologie végétale. *Le François, Paris, 1933.*
41. GUILLIERMOND et OBATON. — Sur l'action du pH sur la coloration vitale dans les cellules végétales. *C. R. Soc. Biol., 116, 984, 1934.*
42. HADJIOLOFF. — Emploi de solution savonneuse de Soudan pour la coloration du tissu adipeux. *Bull. Hist. appl., 6, 221, 1929.*
43. HATTORI (K.). — Kolloidstudien über den Bau der roten Blutkörperchen und über Hämolyse. III. Ultramikroskopische Untersuchungen an Lipoiden. *Biochem. Zeitschrift, 119, 45, 1921.*
44. HOLLEMAN. — Traité de chimie organique. *A. Michel, Paris, 1928.*
45. HUREL-PY (G.). — Recherches cytologiques sur l'assise nourricière des microspores et les microspores de plantes vasculaires. *Rev. gén. Bot., 44, 316, 1932.*
46. ILJIN (W. S.). — Desiccation and decay of the cells of the red cabbage. *Preslia, 11, 45, 1932.*
47. LÉGER (E.). — Sur l'hordénine : alcaloïde nouveau retiré des germes, dits touraillons, de l'Orge. *C. R. Ac. Sc., 142, 108, 1906.*

48. LEULIER et NOËL. — Détection histochimique de la cholestérine. *Bull. Hist. appl.*, **3**, 316, 1926.
49. LEULIER et REVOL. — Sur le cholestérol des surrénales : détection histochimique et dosages chimiques. *Bull. Hist. appl.*, **7**, 242, 1930.
50. LIPPMAA. — Die Anthocyanophore der Erythræa Arten. *Beih. z. bot. Centr.*, 1926.
51. LISON (L.). — Étude sur l'histochimie des corps gras. *Bull. Hist. appl.*, **10**, 237 et 292, 1933.
52. ID. — Sur de nouveaux colorants histologiques spécifiques des lipides. *C. R. Soc. Biol.*, **115**, 202, 1934.
53. LOISEL (G.). — Essai sur la technique microchimique comparative de la lécithine et des graisses neutres. *C. R. Soc. Biol.*, **55**, 703, 1903.
54. LUBIMENKO (V. N.). — Traité de Botanique générale. Gauthier-Villars, Paris, 1927.
55. MACHEBŒUF (M.). — Recherches sur les lipides, les stérols et les protéides du sérum et du plasma sanguins. *Thèse Sciences, Paris*, 1928.
56. MANGENOT (G.). — Données morphologiques sur la matière vivante. Guillon, Paris, 1930.
57. MANUEL (J.). — Recherches sur la formation des stérides dans les chloroplastes de certaines Cactées. *Rev. gén. Bot.*, **48**, 1936.
58. MARZA (V. D.) et MARZA (E.). — Localisation histochimique du cholestérol dans les ovules en croissance et dans l'œuf de poule, méthodes et résultats. *Bull. Hist. appl.*, **9**, 313, 1932.
59. MATRUCHOT et MOLLIARD. — Sur l'identité des modifications de structure produites dans les cellules végétales par le gel, la plasmolyse et la fanaison. *C. R. Ac. Sc.*, **132**, 495, 1901.
60. MAYER et SCHAEFFER. — Recherches sur les constantes cellulaires. *Journ. Physiol. Path. gén.*, 1914.
61. MERZ (W.). — Ueber das Vorkommen von ätherunlöslichen Lecithinen im Gehirn. *Zt. f. physiol. Chem.*, **196**, 1931.
62. MESNARD (E.). — Recherches sur la formation des huiles grasses et des huiles essentielles chez les végétaux. *Ann. Sc. nat.*, 1894.
63. MILOVIDOV (P.). — Einfluss der Zentrifugierung auf das Vakuom. *Protoplasma*, 1930.
64. MIRANDE (M.). — Sur la formation d'anthocyanine sous l'influence de la lumière dans les écailles des bulbes de certains Lis. *C. R. Ac. Sc.*, **175**, 429 et 496, 1922.
65. ID. — Sur des organites élaborateurs particuliers (stérinoplastes) de l'épiderme des écailles de bulbes de Lis blanc. *C. R. Ac. Sc.*, **176**, 327, 1923.
66. ID. — Sur la nature protéolipoïdique des stérinoplastes du Lis blanc. *C. R. Ac. Sc.*, **176**, 596, 1923.
67. ID. — Sur la nature de la sécrétion des stérinoplastes du Lis blanc. *C. R. Ac. Sc.*, **176**, 769, 1923.
68. ID. — Sur les états de la liliostérine au cours de la vie des écailles bulbaires du Lis blanc. *C. R. Ac. Sc.*, **179**, 639, 1924.
69. ID. — Sur les propriétés optiques des stérinoplastes et de la phytostérine des bulbes de Lis blanc. *C. R. Ac. Sc.*, **179**, 986, 1924.
70. ID. — Sur la phytostérine des écailles des bulbes dans les espèces du genre *Lilium*. *C. R. Ac. Sc.*, **179**, 1768, 1924.
71. ID. — (Note posthume). Nouvelles recherches sur la présence d'enclaves stériniques dans les feuilles et les fleurs de Lis. *C. R. Ac. Sc.*, **238**, 202, 1936.

72. MIRATON. — Recherches morphologiques sur le bulbe de Lis blanc. Thèse, Pharmacie, Montpellier, 1925.
73. MOLLIARD (M.). — Nutrition de la plante. Doin, Paris, 1921-25.
74. MOLISCH (H.). — Ueber amorphe und kristallisierte Anthocyan. Bot. Zeitung, 1905.
75. ID. — Mikrochemie der Pflanze. Fischer, 2^e éd., Jéna, 1921.
76. NAGELI (C.). — Die Stärkekörner. Munich, 1858.
77. OVERTON (E.). — Ueber die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen- und Tierzelle. Vierteljahrsh. Nat. Ges. in Zurich, 40, 159, 1895.
78. ID. — Studien über die Aufnahme der Anilinfarbe durch die lebende Zelle. Jahrb. f. wiss. Bot., 34, 1900.
79. POLITIS (I.). — Sopre speciali corpi cellulari che formano antocyanine. Atti Istit. bot. R. Univ. di Pavia, 14, 335, 1914.
80. POPOVICI (H.). — Sur l'origine, la détection et le rôle des essences végétales. Bull. Hist. appl., 4, 1927.
81. REILHES (R.). — Effets de la concentration de l'iode sur la coloration de l'amidon. Rev. gén. Bot., 41, 177, 1931.
82. ID. — Sur la nature et la signification des stérinoplastes. C. R. Soc. Biol., 113, 267, 1933.
83. ID. — Sur la présence dans les fleurs de *Lilium candidum* et de *Lilium longiflorum Harrisii* de concrétions vacuolaires lipoprotéiques semblables aux « stérinoplastes ». C. R. Soc. Biol., 113, 993, 1933.
84. ID. — Sur la constitution chimique des concrétions lipidiques (stérinoplastes de Mirande) des cellules épidermiques des écailles du bulbe de *Lilium candidum*. C. R. Soc. Biol., 115, 622, 1934.
85. ID. — Modifications des concrétions lipidiques (stérinoplastes de Mirande) dans le bulbe de *Lilium candidum* suivant la température. C. R. Ac. Sc., 198, 1629, 1934.
86. ID. — Sur la localisation histochemique de l'hordénine dans les plantules d'Orge. C. R. Soc. Biol., 1936.
87. REVOL. — Contribution à l'étude des glandes surrénales chez les Mammifères. Thèse Sciences, Lyon, 1931.
88. ROMIEU (M.). — Méthode de détection histochemique de la cholestérine. C. R. Soc. Biol., 92, 787, 1925.
89. ID. — Une réaction histochemique nouvelle des lécithines : la réaction iodophile. C. R. Ac. Sc., 184, 1206, 1927.
90. ID. — Signification de la réaction iodophile du protoplasma et de quelques autres constituants des tissus. C. R. Soc. Biol., 96, 1230, 1927.
91. ROQUES (N.). — Sur un nouveau procédé de fixation et de coloration des mucilages chez les végétaux. C. R. Soc. Biol., 97, 85, 1927.
92. SAVELLI (R.). — Amido lipidico. Bull. Orto bot. Napoli, 12, 1933.
93. ID. — Ulteriori osservazioni sugli eleocloroplasti. Note Bot. e Biol. Catania, 11, 43 et 83, 1933.
94. ID. — Osservazioni su alcuni elaborati delle cellule del clorenchima. Rend. C. Ac. Lincei, 20, 1934.
95. SCHARINGER (W.). — Cytologische Beobachtungen an Ranunculaceen-Blüten. Protoplasma, 25, 404, 1936.
96. SCHLÖESING (Th.). — Utilisation par les plantes de la potasse dissoute dans les eaux du sol. C. R. Ac. Sc., 130, 422, 1900.
97. SIMONET (M.). — Recherches cytologiques et génétiques chez les Iris. Bull. biol. Fr. et Belgique, 66, 255, 1932.

98. ID. — Nouvelles recherches cytologiques et génétiques chez les Iris. *Ann. des Sc. nat.*, **16**, 229, 1934.
 99. SOSTER (N.). — Sulla presenza di un corpo di aspetto oleaginoso nelle cellule epidermiche delle foglie di *Haworthia cymbiformis*. *Rend. C. Ac. Lincei*, **19**, 10, 1934.
 100. STOKLASA (J.). — Die Assimilation des Lecithins durch den Pflanzen. *S. B. Ak. Wien*, **104**, 1895.
 101. ID. — Ueber die Entstehung und Umwandlung des Lecithins in der Pflanze. *Z. physiol. Chem.*, **25**, 398, 1898.
 102. THOMAS (P.). — Cours de chimie biologique. *Presses Univ. de Fr.*, Paris, 1926-29.
 103. ID. — Manuel de biochimie. *Masson*, Paris, 1936.
 104. VERNE (J.). — Recherches sur la réaction de Schiff en histochimie. *C. R. Ass. Anat.*, 23^e R., 465, 1928.
 105. ID. — Couleurs et pigments des êtres vivants. *A. Colin*, Paris, 1930.
 106. VILMORIN-ANDRIEUX. — Les fleurs de pleine terre, Paris, 1894.
 107. WATTIEZ et STERNON. — Éléments de chimie végétale. *Masson*, Paris, 1935.
 108. WESTON (F.-E.). — Manuel pratique d'analyse organique. *Dunod*, Paris, 1921.
 109. WURTZ (Ad.). — Dictionnaire de chimie. *Hachette*, Paris, 1874-1905.
 110. ZWEIBAUM et MANGENOT. — Application à l'étude histochimique des végétaux d'une méthode permettant la coloration vitale et post-vitale des graisses de la cellule animale. *C. R. Soc. Biol.*, **89**, 540, 1923.
 111. ZWEIBAUM (J.). — Sur un nouveau procédé de coloration des graisses. *Bull. Hist. appl.*, **10**, 210, 1933.
-

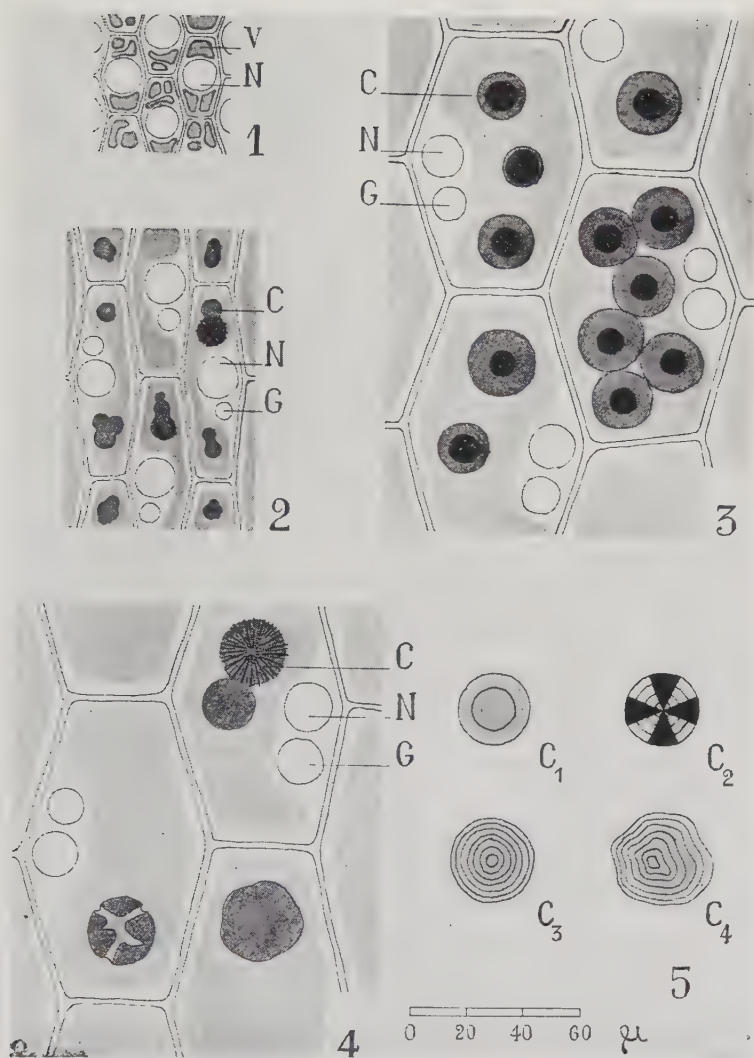
EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE I. — *Apparition et transformations des corps intravacuolaires dans l'épiderme des écailles de plus en plus extérieures du bulbe de Lilium candidum (coloration vitale par le rouge neutre).*

1. Épiderme prélevé sur l'une des plus petites écailles situées au centre du bulbe; V, jeunes vacuoles d'aspect homogène.
2. Épiderme prélevé sur une écaille un peu plus grande; C, corps concrétionnés dans les vacuoles; G, globules oléagineux intracytoplasmiques.
3. Épiderme prélevé sur une écaille moyenne; C, concrétions intravacuolaires présentant la forme des « stérinoplastes » décrits par Mirande.
4. Épiderme prélevé sur une écaille plus extérieure; C, concrétions intravacuolaires corrodées ou cristallisées.
5. Corps concrétionnés dans l'épiderme des écailles en voie de dessiccation : striation concentrique et phénomène optique de la croix noire, puis amas de cordons pelotonnés.

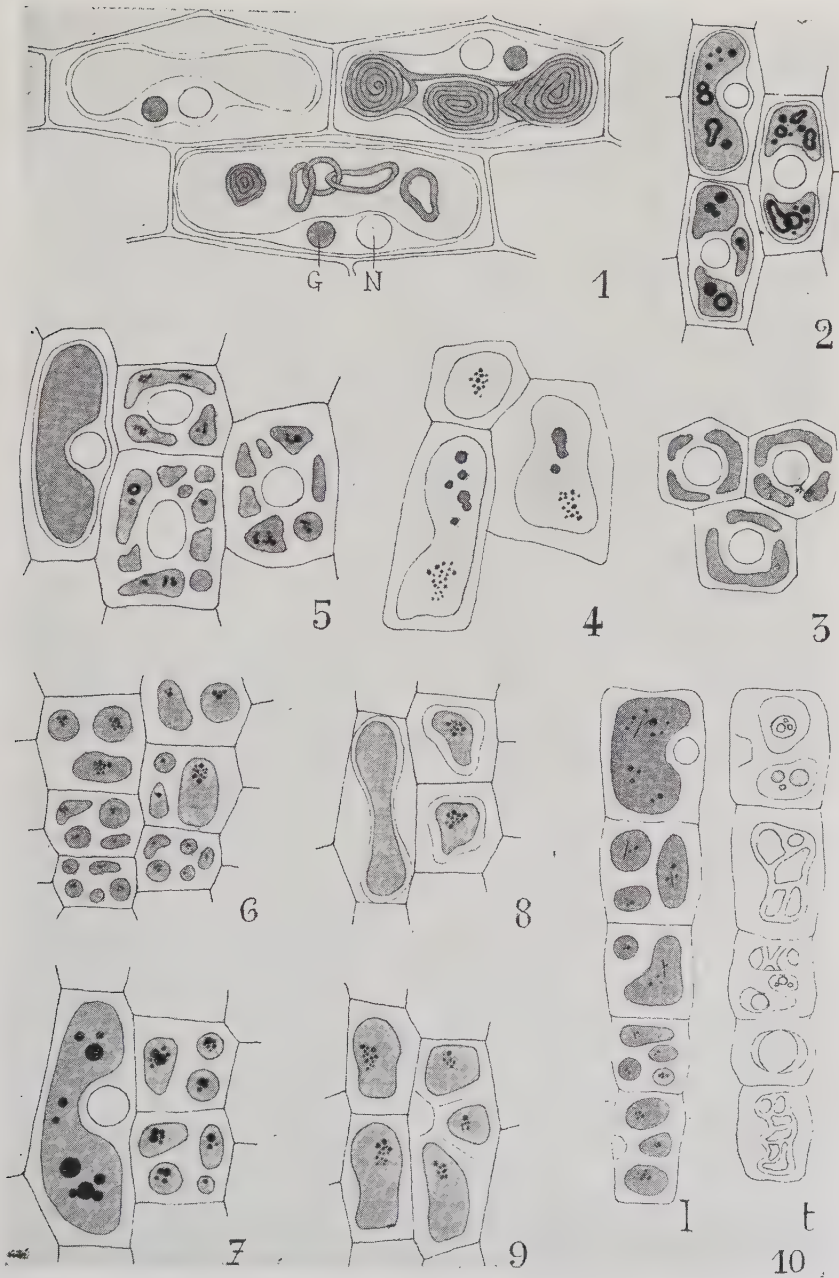
PLANCHE II. — *Coloration des vacuoles par le bleu d'indophénol.*

1. Épiderme prélevé sur une petite écaille du bulbe de *Lilium candidum* : dans les vacuoles colorées en bleu clair et légèrement contractées apparaissent des corps myéliniformes colorés en bleu foncé.
2. Épiderme prélevé sur une écaille encore plus jeune : corps granuleux ou annelés présentant une teinte bleue très foncée dans les vacuoles un peu moins intensément colorées.
3. Cellules du méristème de la racine de Lis.
4. Cellules situées vers la pointe des racines d'Iris.
5. Cellules de la coiffe et du méristème dans la racine de Jacinthe.
6. Cellules du méristème de la racine de Blé (cultivé normalement sur le bleu d'indophénol extrêmement étendu).
7. Cellules de la coiffe et du méristème de la racine de Blé (cultivé sur le même colorant mais en présence de lécithine).
- 8 et 9. Cellules situées vers la pointe des racines de Haricot et de Melon.
10. Racine de Ricin : une file de cellules présentant du tanin dans leurs vacuoles (t) et une autre file de cellules n'en présentant pas (l).



Apparition et transformations des concrétions lipidiques intravacuolaires dans l'épiderme des écailles de plus en plus extérieures du bulbe de *Lilium candidum* : coloration vitale par le rouge neutre.

N, noyau; G, globule gras intracytoplasmique; V, jeunes vacuoles; C, concrétions intravacuolaires.



Coloration des vacuoles par le bleu d'indophénol dans l'épiderme des écailles bulbaïres de Lis (1 et 2) et dans les racines de Lis (3), Iris (4), Jacinthe (5), Blé (6), Haricot (8), Melon (9) et Ricin (10, l).

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté

Respiration de la fleur

Vu et approuvé :

Paris, le 30 Juin 1936

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

CH. MAURAIN

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

S. CHARLÉTY

Imprimeries OBERTHUR, Rennes-Paris.

(1826-36).
